

**Das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone
mit Einstrom vom Kniegelenk der Ratte unter selektiver
Aktivierung der spinalen Prostaglandin E-Rezeptoren
EP₁ – EP₄**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Philipp Teschner

geboren am 29.06.1977 in Nürnberg

Gutachter 1: Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible, Institut für Neurophysiologie der FSU Jena

Gutachter 2: PD Dr. med. Winfried Meißner, Klinik f. Anästhesiologie u. Intensivtherapie der FSU Jena

Gutachter 3: Prof. Dr. med. Wilfrid Jänig, Institut für Physiologie der CAU Kiel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.02.2008

Für Ulli

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Aktionspotential
aqua dest.	destilliertes Wasser
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Ca^{2+}	Calciumionen
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGRP	calcitonin gene related peptide
CIPA	congenital insensitivity to pain with anhidrosis
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Prostaglandin D-Rezeptor
DRG	dorsal root ganglia
EC_{50}	effektive Konzentration
EP	Prostaglandin E-Rezeptor
FP	Prostaglandin F-Rezeptor
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
h	Stunde
H_2SO_4	Schwefelsäure
HT	high treshold
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
i.v.	intravenös
IC_{50}	intrinsische Konzentration
IPSC	inhibitorischer präsynaptischer Strom
IP	Prostaglandin I-Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

$K_2Cr_2O_7$	Kaliumdichromat
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K_i	Bindungskonstante
L_1	1. Lendenwirbel
L_4	4. Lendenwirbel
(m)RNA	(messenger)-Ribonukleinsäure
M	Mol (molar)
$M\Omega$	Megaohm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimol(ar)
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mrd.	Milliarde
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol(ar)
N	Newton
n	Anzahl
NaCl	Kochsalz
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
nM	Nanomol(ar)
NO	Stickstoffmonooxid
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction
pg	Pikogramm
PG	Prostaglandin
PGD_2	Prostaglandin D_2

Abkürzungsverzeichnis

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKA	Proteinkinase A
RF	rezeptives Feld
s	Sekunde
S I	primärer somatosensorischer Kortex
S II	sekundärer somatosensorischer Kortex
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TENS	transkutane elektrische Nervenstimulation
TTX	Tetrodotoxin
TP	Thromboxan-Rezeptor
Tx	Thromboxan
TX A ₂	Thromboxan A ₂
WDR	wyde dynamic range
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Akute und chronische Schmerzen	3
2.2	Schmerz und Nozizeption	5
2.3	Periphere und zentrale Nozizeption	5
2.3.1	Nozizeptoren	5
2.3.2	Zentrale Weiterleitung nozizeptiver Signale	8
2.3.3	Das Schmerzerlebnis	9
2.4	Endogene Hemmung.....	10
2.5	Veränderungen im nozizeptiven System bei Entzündung	11
2.5.1	Pathophysiologie der Entzündung.....	11
2.5.2	Periphere Sensibilisierung.....	12
2.5.3	Zentrale Sensibilisierung.....	13
2.6	Prostaglandine.....	14
2.6.1	Synthese der Prostaglandine.....	15
2.6.2	Prostaglandine im Rückenmark.....	15
2.7	Die Prostanoid-Rezeptoren.....	16
2.8	Die EP-Rezeptoren.....	19
2.8.1	EP ₁ -Rezeptoren	20
2.8.2	EP ₂ -Rezeptoren	21
2.8.3	EP ₃ -Rezeptoren	21
2.8.4	EP ₄ -Rezeptoren	22
2.9	Ziele dieser Arbeit.....	23
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Die Testsubstanzen.....	25
3.2	Versuchsvorbereitung.....	27
3.2.1	Herstellung der Elektroden.....	27
3.2.2	Präparation der Ratte	28
3.3	Versuchsaufbau.....	29
3.4	Versuchsablauf.....	31
3.4.1	Suche nach einem geeigneten Neuron.....	31
3.4.2	Versuchsprotokoll	33
3.5	Datenverarbeitung	36
3.5.1	Datenaufzeichnung.....	36
3.5.2	Datenanalyse und Statistik	37
3.5.3	Normierung der Ergebnisse zum Vergleich	37
3.6	Beispiel eines Versuches	38

3.6.1	Verarbeitung der Rohdaten.....	38
3.6.2	Grafische Darstellung der Daten des Beispielsperiments P197	40
4	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Überblick über die Neurone.....	41
4.2	Spinale Applikation der Vehikellösung.....	42
4.3	Spinale Applikation von PGE ₂	43
4.4	Spinale Applikation des EP ₁ -Agonisten ONO-DI-004	45
4.5	Spinale Applikation des EP ₂ -Agonisten Butaprost	48
4.6	Spinale Applikation des EP ₃ -Agonisten ONO-AE-248	51
4.7	Spinale Applikation des EP ₄ -Agonisten ONO-AE1-329	54
4.8	Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.....	57
5	DISKUSSION.....	59
5.1	Versuchsdurchführung.....	59
5.1.1	in-vivo-Experimente.....	59
5.1.2	Anästhesie und Präparation	60
5.1.3	Eigenschaften der untersuchten Neuronen	60
5.1.4	Mechanische Stimulation	61
5.1.5	Spinale Applikation der Testsubstanzen.....	62
5.1.6	Untersuchung der EP-Agonisten	62
5.1.7	Dauer der Applikation.....	63
5.2	Der Einfluss von PGE ₂ auf das neuronale Antwortverhalten	64
5.3	Die Bedeutung des EP ₁ -Rezeptors	66
5.4	Die Bedeutung des EP ₂ -Rezeptors	67
5.5	Die Bedeutung des EP ₃ -Rezeptors	69
5.6	Die Bedeutung des EP ₄ -Rezeptors	70
5.7	Zusammenfassende Diskussion aller Ergebnisse.....	71
5.8	Fazit.....	73
5.9	Ausblick	74
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	76
7	TABELLENVERZEICHNIS.....	87
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
9	ANHANG	89

1 Zusammenfassung

Als Folge einer peripheren Schädigung, wie z. B. einer Gelenkentzündung, kommt es im Rückenmark häufig zur Ausbildung einer zentralen Sensibilisierung. Diese resultiert in einer Absenkung der Erregungsschwellen von nozizeptiven Neuronen, einer Verstärkung der neuronalen Antwort auf Reizung des betroffenen Gewebes sowie einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes von Rückenmarkneuronen, d. h. das periphere Areal, aus welchem das Neuron nozizeptiven Input erhält, dehnt sich aus.

Durch das Auftreten einer Verletzung bzw. Entzündung im peripheren Gewebe kommt es lokal durch Wirkung der Cyclooxygenase (COX) unter anderem zur Synthese von Prostaglandin E_2 , welches über eine Sensibilisierung von Nozizeptoren mit resultierender Absenkung der Reizschwelle zur primären Hyperalgesie führt. In jüngerer Zeit konnte nachgewiesen werden, dass nach peripherer Entzündung bzw. Verletzung, vermittelt durch eine Hochregulierung der COX-2, PGE_2 im Rückenmark synthetisiert wird, wo es an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf intrinsischen spinalen und primär afferenten Neuronen bindet und über unterschiedliche Wirkmechanismen eine zentrale Sensibilisierung der Rückenmarkneurone induziert. Es gelang auch der Nachweis einer basalen PGE_2 -Produktion in Hinterwurzelganglien und im Rückenmark. Durch die Wirkung von intrathekal applizierten, nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) wie z. B. Indometacin, kann über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese die PGE_2 -vermittelte Hyperalgesie abgeschwächt werden.

Im Rückenmark konnten vier Rezeptortypen (EP_1 – EP_4) für Prostaglandin E_2 nachgewiesen werden, welche die Wirkung von PGE_2 über verschiedene Wirkungsmechanismen vermitteln. Der EP_3 -Rezeptor lässt sich wiederum in mehrere Subtypen ($EP_{3\alpha}$, $EP_{3\beta}$, $EP_{3\gamma}$) unterscheiden. Während die EP_1 -, EP_3 - und EP_4 -Rezeptoren in Hinterwurzel-Ganglien (*Dorsal Root Ganglia* = DRG) exprimiert werden, was auf eine Transmitterfreisetzung von primär afferenten Fasern durch Prostaglandine hindeutet, finden sich die EP_2 -Rezeptoren nach gegenwärtiger Ansicht postsynaptisch in Rückenmarkneuronen, was ebenfalls postsynaptische Wirkungen von PGE_2 erwarten lässt. Mittlerweile wurden EP_2 -Rezeptoren jedoch auch in Hinterwurzel-Ganglien nachgewiesen. Die Aktivierung des EP_1 -Rezeptors bewirkt über die Öffnung eines Calcium-Kanals einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit resultierender Kontraktion glatter Muskulatur sowie einer verstärkten Freisetzung von Neurotransmittern. Die G_s -Protein-

gebundenen EP₂- und EP₄- Rezeptoren sowie einige Subtypen des EP₃-Rezeptors (EP_{3β} und EP_{3γ}) vermitteln über eine Stimulation der Adenylatzyklase einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel mit nachfolgender Relaxierung glatter Muskulatur, während der G_i-Protein-gekoppelte EP_{3α}-Rezeptor via Hemmung der Adenylatzyklase eine Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels hervorruft.

In der vorliegenden Arbeit wurden an anästhesierten Ratten extrazelluläre Ableitungen von nozizeptiven Hinterhornneuronen mit Einstrom aus dem Kniegelenk durchgeführt und der Einfluss der topischen Gabe von selektiven EP-Rezeptoragonisten auf das neuronale Antwortverhalten unter nicht-noxischer und noxischer Stimulation des Kniegelenks untersucht. Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Führt die selektive Aktivierung einzelner EP-Rezeptoren bei normalen Ratten zu einem veränderten Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone?
- Was bewirkt die selektive Aktivierung eines EP-Rezeptortyps hinsichtlich Reizschwelle, Entladungsrate und Ausdehnung des rezeptiven Feldes eines nozizeptiven Neurons?
- Über welche EP-Rezeptoren bewirkt PGE₂ eine spinale Übererregbarkeit, welche zur Schmerzsteigerung führt?

Während die spinale Applikation von PGE₂ sowie spezifischer Agonisten an den EP₁-, EP₂- und EP₄-Rezeptoren (ONO-DI-004, Butaprost, ONO-AE1-329) dosisabhängig zu einer Steigerung der neuronalen Erregbarkeit sowie zur Ausbildung einer zentralen Sensibilisierung führte, bewirkte die Gabe des EP₃-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 unter Normalbedingungen keine Veränderung der neuronalen Antwort. In anderen Studien unseres Instituts wird vielmehr eine Hemmung entzündungsbedingter spinaler Übererregbarkeit durch die Gabe des EP₃-Rezeptor-Agonisten beschrieben.

Diese Versuchsergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die spinale PGE₂-Wirkung mit resultierender neuronaler Übererregbarkeit und Ausbildung einer zentralen Sensibilisierung über die EP₁-, EP₂- bzw. EP₄-Rezeptoren vermittelt werden kann. Der EP₃-Rezeptor hingegen scheint unter normalen (im Gegensatz zu entzündlichen) Bedingungen keinen Einfluss von PGE₂ auf die neuronale Antwort vermitteln.

Die über die Funktionen der einzelnen EP-Rezeptor-Subtypen gewonnenen Erkenntnisse könnten eine Grundlage zur spezifischen medikamentösen Behandlung von Entzündungsschmerzen darstellen. Die gezielte Blockierung der EP₁-, EP₂- oder EP₄-Rezeptoren bzw. die selektive Aktivierung des EP_{3α}-Rezeptors unter inflammatorischen Bedingungen könnten sich dabei als effektive Therapieansätze herausstellen.

2 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich im Wesentlichen mit der Rolle der vier spezifischen Rezeptoren für Prostaglandin E_2 (EP_1 , EP_2 , EP_3 , EP_4) für die spinale Schmerzverarbeitung. Im Folgenden soll zunächst ein kurz gefasster, theoretischer Überblick über das nozizeptive System, seine Veränderungen unter entzündlichen Bedingungen sowie über Prostanoiden, insbesondere das Prostaglandin E_2 und die vier PGE_2 -Rezeptoren ($EP_1 - EP_4$) im Rückenmark gegeben werden.

2.1 Akute und chronische Schmerzen

*Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis,
das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist
oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.*

(International Association for the Study of Pain, 1979; vgl. Internetreferenz I)

In unserer Gesellschaft sind es meist Schmerzen, die einen Patienten dazu bringen, einen Arzt zu konsultieren, da sie für den Patienten oft das unangenehmste bzw. das erste bewusst wahrgenommene Symptom einer Erkrankung oder Gewebsschädigung darstellen, und nicht selten auch das einzige. Gerade bei länger andauernden Erkrankungsprozessen ignorieren bzw. tolerieren Patienten oft die unterschiedlichsten Symptome, solange keine Schmerzen auftreten. So werden zum Beispiel maligne Tumoren häufig erst dann erkannt, wenn sie mit Schmerzen einhergehen, was oft erst bei fortgeschrittenen bzw. inoperablen Befunden der Fall ist.

Schmerzen lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten einteilen, z. B. nach ihrer Herkunft (in Oberflächen-, Tiefen- oder Eingeweideschmerzen) oder nach ihrer Dauer. Die Literatur unterscheidet hier zwischen akuten und chronischen Schmerzen.

Akute Schmerzen weisen auf eine drohende oder eingetretene Gewebsschädigung hin, haben Signal- und Warnfunktion und lassen sich durch Beseitigung der Ursache meist rasch kausal therapieren (Schaible & Schmidt, 1995).

Die Bedeutung des akuten Schmerzes als Warnfunktion verdeutlicht sich bei der Betrachtung des seltenen Krankheitsbildes der angeborenen Schmerzunempfindlichkeit,

wie sie z. B. beim CIPA (Congenital insensitivity to pain with anhidrosis) oder dem Riley-Day-Syndrom auftritt: die Patienten, denen von Geburt an jegliche nozizeptiven Reflexe fehlen, ziehen sich von Kindheit an typischerweise sehr häufig Verbrennungen und andere Verletzungen zu (Handwerker, 2001), an deren Folgen viele von ihnen frühzeitig versterben.

Als *chronisch* wurden Schmerzen früher im Allgemeinen dann bezeichnet, wenn sie länger als ein halbes Jahr andauerten. Mittlerweile hat man diese pauschale Einteilung jedoch in vielen Fällen wieder verlassen, so können bestimmte Schmerzzustände, wie sie z. B. beim Morbus Sudeck (Complex Regional Pain Syndrome) oder nach einer Infektion mit Zoster-Viren auftreten, bereits nach relativ kurzer Zeit (einige Wochen) in ein chronisches Stadium übergehen.

Chronische Schmerzen können Zeichen einer dauerhaften Gewebeschädigung sein (z. B. bei einer Arthritis) oder psychische Ursachen haben.

Bei chronischen Schmerzen besteht die Gefahr einer Lösung des Schmerzerlebens von der Ursache. Der Schmerz stellt in diesem Fall ein eigenständiges Krankheitsbild dar, welches sich vom akuten Schmerz insbesondere dadurch unterscheidet, dass er hier keine physiologische Funktion erfüllt (Schaible & Schmidt, 1995) und somit als pathologisch anzusehen ist. Bei der überwiegenden Zahl der Patienten mit Rückenschmerzen sind diese unspezifisch, ohne dass ein anatomisch-pathologisches Korrelat gefunden werden kann (Gerdesmeyer et al., 2004). Nach Schätzungen des Bundesministeriums für Bildung und Forschung leiden in Deutschland rund sechs Millionen Menschen an chronischen Schmerzen und bei 500.000 bis 600.000 Patienten liegt ein schwer therapierbares Schmerzsyndrom vor. Den größten Anteil daran haben Rückenschmerzen, gefolgt von Kopfschmerzen.

Patienten mit chronischen Schmerzen stehen oft unter hohem Leidensdruck, da in vielen Fällen mangels kausaler Behandlungsmöglichkeiten keine befriedigenden Therapieergebnisse erzielt werden können.

Daneben stellen die chronischen Schmerzen einen nicht zu unterschätzenden wirtschaftlichen Faktor dar. Durch Rückenschmerzen fallen jährlich geschätzt mehr als 15,3 Mrd. Euro Kosten durch die Behandlung, Rehabilitation, Arbeitsausfälle und frühzeitige Berentung an, während alleine die durch Kopfschmerzen verursachten Kosten sich jährlich auf etwa 2,5 Milliarden Euro belaufen (vgl. Internetreferenz II).

Da bisher nur in unzureichendem Maße befriedigende Behandlungskonzepte für chronische Schmerzen erarbeitet wurden, besteht ein wichtiges Ziel der

neurophysiologischen Grundlagenforschung darin, das nozizeptive System besser zu verstehen, um künftig verbesserte Therapiekonzepte anwenden zu können.

2.2 Schmerz und Nozizeption

In der Literatur wird zwischen Schmerz und Nozizeption unterschieden. *Schmerz* ist ein Gefühlserlebnis, bei dem psychisch-emotionale Komponenten eine wichtige Rolle spielen. Da Schmerzen subjektiv empfunden werden, ist es nur schwer möglich, sie objektiv zu messen oder einheitlich zu definieren. Ein allgemein gebräuchliches Werkzeug zur Messung der Schmerzempfindung ist die Visuelle Analogskala (VAS), welche einen (oft nur unzureichenden) Versuch darstellt, das Schmerzempfinden objektiv zu quantifizieren.

Nozizeption (lat. *noxa* = Schaden) hingegen beschreibt alle objektiv messbaren neuronalen Prozesse der Rezeption, Weiterleitung und zentralnervösen Verarbeitung eines potentiell oder tatsächlich gewebeschädigenden Reizes (Schaible & Schmidt, 1995).

Schmerz und Nozizeption sind eng miteinander verknüpft, bedingen einander aber nicht zwingend. Das Schmerzempfinden ist im Gegensatz zur Nozizeption vom Bewusstseinszustand abhängig. Dies zeigt sich am Beispiel einer Allgemeinanästhesie: hier wird die bewusste Schmerzwahrnehmung durch die Narkose ausgeschaltet. Dennoch können Reize, je nach Narkosetiefe, noch nozizeptive Reflexe, wie z. B. Wegziehreflexe, auslösen (Handwerker, 2001) oder zu kardiovaskulären und respiratorischen Reaktionen führen (Zimmermann, 1993).

2.3 Periphere und zentrale Nozizeption

2.3.1 Nozizeptoren

Bei tierischen Organismen finden sich spezielle Rezeptoren für die Registrierung von Schmerzen, die als Nozizeptoren (lat. *nocere* = schaden) bezeichnet werden. Diese besitzen eine hohe Erregungsschwelle und werden nur durch gewebebedrohende oder gewebeschädigende Reize aktiviert (Schaible & Schmidt, 1995).

Nozizeptoren sind als freie, d. h. nicht-korpuskuläre Nervenendigungen in fast allen Organen vorhanden. Die Zellkörper der Nozizeptoren liegen in den Hinterwurzelganglien (DRG = dorsal root ganglia) des Rückenmarks. Durch Sensormoleküle in den sensiblen

Endigungen der Nozizeptoren werden mechanische (z. B. schmerzhafter Druck, Nadelstich), thermische (z. B. Hitze, Kälte) oder chemische (z. B. Bradykinin, Prostaglandin) Reize in ein Sensorpotential codiert. Dieses löst im Nozizeptor bei genügend hoher Amplitude ein Aktionspotential aus, das über sensorische Nervenfasern zum Rückenmark geleitet wird (Schaible & Richter, 2004). Abbildung 2.1 liefert einen schematischen Überblick über die Rolle und Funktion eines peripheren Nozizeptors.

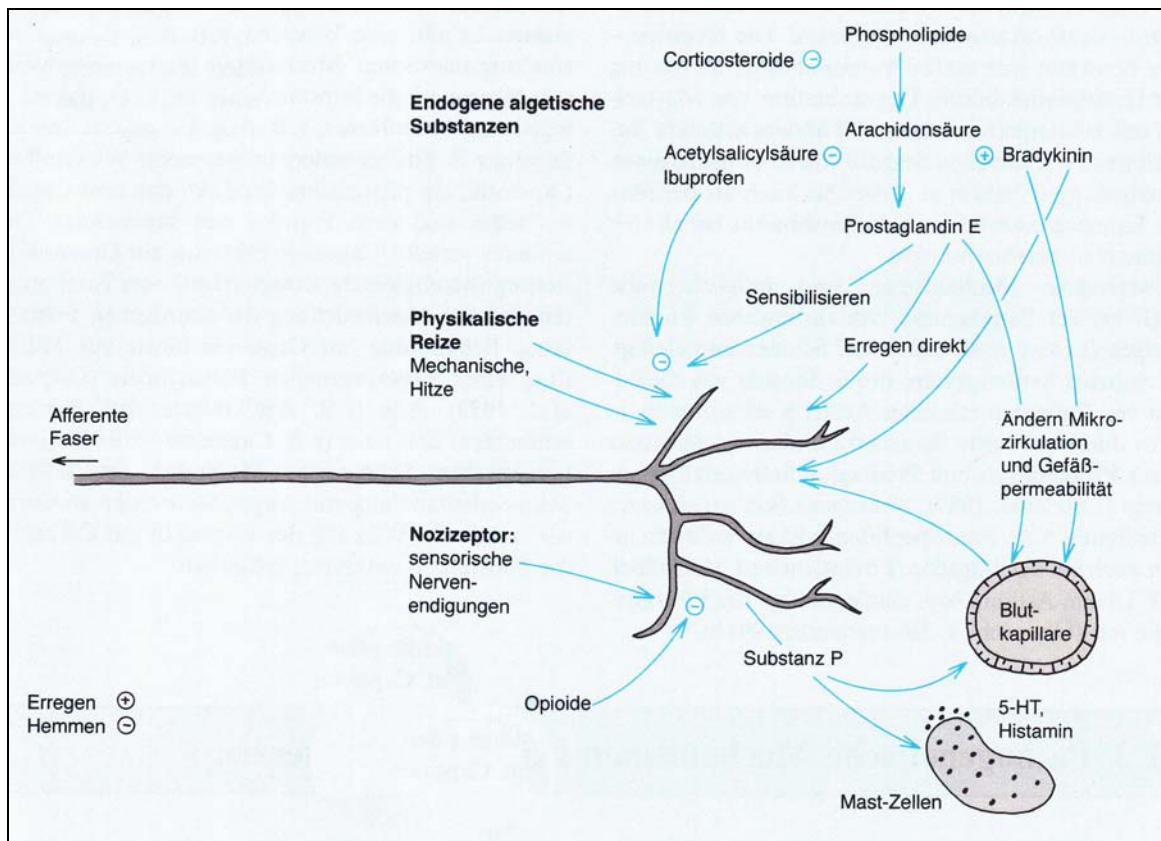


Abbildung 2.1: Nozizeptor (Quelle: Zenz & Jurna, 1993, S. 5)

Tabelle 2.1 gibt die Einteilung verschiedener Nervenfasern nach Erlanger und Gasser wieder (Gasser & Grundfest, 1939):

Tabelle 2.1: Klassifikation der Nervenfasern nach Erlanger / Gasser (Quelle: Schmidt & Thews, 1995, S. 37)

Fasertyp	Funktion	Mittlerer Faserdurchmesser	Mittlere Leitungsgeschwindigkeit
A α	Primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch zu Skelettmuskeln	15 μ m	100 m/s (70 – 120 m/s)
A β	Hautafferenzen für Berührung und Druck	8 μ m	50 m/s (30 – 70 m/s)

A γ	Motorisch zu Muskelspindeln	5 μm	20 m/s (15 – 30 m/s)
A δ	Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption	< 3 μm	15 m/s (12 – 30 m/s)
B	Sympathisch präganglionär	3 μm	7 m/s (3 – 15 m/s)
C (marklos)	Hautafferenzen für Nozizeption, sympathische postganglionäre Efferenzen	1 μm	1 m/s (0,5 – 2 m/s)

Nozizeptive Reize werden dabei vor allem von hochschwelligen Fasern der Typen A δ und C codiert, welche nach der Klassifikation von Lloyd und Hunt den Fasergruppen III und IV entsprechen (Lloyd & Chang, 1948). Dies lässt sich experimentell belegen: Bei differenzierter elektrischer Reizung eines Nerven werden durch schwache Reize nur dicke, d. h. niederschwellige Afferenzen erregt (A β -Fasern), was nicht zu Schmerzempfindungen führt. Erst durch höhere Stromstärken werden die dünnen, hochschwelligen Afferenzen (A δ - und C-Fasern) erregt, was Schmerz hervorruft (Schaible & Schmidt, 1995). Im Gegenzug fallen bei konstantem kräftigem Druck auf einen Hautnerven nach einiger Zeit zunächst die über dicke A β -Fasern weitergeleitete Wahrnehmung von Berührungsreizen und dann die Weiterleitung in den A δ -Fasern (vor allem für Kälte) aus. Die Weiterleitung von nozizeptiven Signalen über die dünnen C-Fasern bleibt am längsten erhalten. Solange die Leitung dieser Fasern funktioniert, können durch Hautreize Schmerzen ausgelöst werden.

Nozizeptoren mit C-Faser-Afferenzen kommen deutlich häufiger vor als A δ -Nozizeptoren. Die meisten C-Fasern sind Afferenzen von Nozizeptoren, dennoch werden in manchen C-Fasern auch nicht-nozizeptive Signale weitergeleitet (z. B. von Wärmerezeptoren).

Viele Nozizeptoren können durch verschiedene Arten von Reizen (z. B. mechanische Stimulation, thermische und chemische Noxen) erregt werden. Dies trifft vor allem für die meisten marklosen Nozizeptoren, welche dann als polymodal bezeichnet werden, zu (Handwerker, 2001).

Nozizeptoren besitzen neben ihren afferenten Eigenschaften auch die Fähigkeit, verschiedene Neuropeptide (Substanz P, *calcitonin gene related peptide* = CGRP, Somatostatin) zu synthetisieren und nach Depolarisation im Gewebe freizusetzen, womit sie auch efferente Eigenschaften erfüllen. Dadurch kommt es im Gewebe unter anderem zur Vasodilatation, Austritt von Plasma in den Extravasalraum, Anreicherung von

Makrophagen und Mastzelldegranulation. Dieser Vorgang der nozizeptor-induzierten Entzündung wird neurogene Entzündung genannt (Schaible & Richter, 2004; Handwerker, 2001).

2.3.2 Zentrale Weiterleitung nozizeptiver Signale

Die in den Nozizeptoren erzeugten Aktionspotentiale werden zum Hinterhorn des Rückenmarks geleitet und dort über Synapsen auf sekundäre Neurone übertragen. Glutamat ist der Haupttransmitter, während z. B. CGRP oder Substanz P als Co-Transmitter dienen (Handwerker, 2001). Die graue Rückenmarkssubstanz lässt sich nach zytologischen Kriterien in zehn Rexed-Schichten (Laminae) einteilen (Rexed, 1952), welche in Abbildung 2.2 dargestellt werden.

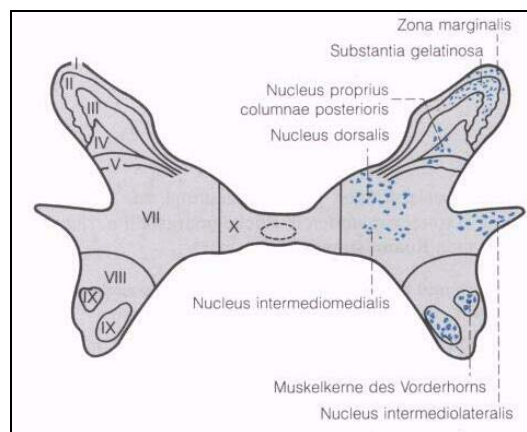


Abbildung 2.2: Laminae des Hinterhorns (Quelle: Drenckmann & Zenker, 1994, S. 444 In: Zenker, 1994)

Das Hinterhorn des Rückenmarks umfasst die Laminae I – VI. Hier endet ein großer Teil der im Segment eintretenden Primärafferenzen. Die dünnen A δ - und C-Fasern ziehen von lateral vor allem zu den oberflächlich liegenden Laminae I und II, während die von medial kommenden dickeren Fasern eher in die tieferen Laminae eintreten. Für die Nozizeption spielen vor allem die Laminae I, II und V eine bedeutende Rolle.

Die Neurone der Lamina I (Zona marginalis oder spongiosa) erhalten neben viszeroafferenten Impulsen vor allem nozizeptive Afferenzen aus der Haut und tieferen Geweben (z. B. Muskeln). Lamina II (Substantia gelatinosa) enthält eine große Zahl markloser Hautafferenzen. In Lamina V liegen Afferenzen (A δ - und C-Fasern) von Haut und tiefen Geweben (Zenker, 1994). Abbildung 2.3 veranschaulicht den Eingang der unterschiedlichen Afferenzen in das Hinterhorn.

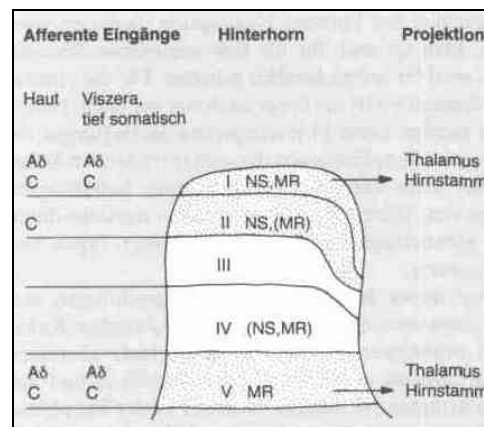


Abbildung 2.3: Afferenzen des Hinterhorns (Quelle: Zenz & Jurna, 1993, S. 20)

Es gibt zwei Typen von Neuronen im Hinterhorn (Handwerker, 2001; Jänig, 1993):

- *Nozizeptorspezifische* Neurone erhalten ausschließlich nozizeptive Afferenzen und liegen vor allem in den oberflächlichen Schichten (Laminae I und II) des Hinterhorns.
- *Multimodale* Neurone antworten auf verschiedene Stimuli wie Berührung, Schmerz und chemische Reize aus Haut, Muskulatur und Eingeweiden. Sie werden auch als wide-dynamic-range-Neurone (WDR-Neurone) bezeichnet und sind vor allem in den tieferen Schichten (Lamina V) des Hinterhorns zu finden.

Ein Teil dieser nozizeptiven Hinterhornneurone leitet Signale über die wichtigste zentrale Schmerzbahn, den Tractus spinothalamicus (Vorderseitenstrangbahn) ins Gehirn (Handwerker, 2001). Ein weiterer Teil dieser Neurone ist als Interneurone in segmental-motorische und vegetative Reflexbögen eingebunden.

2.3.3 Das Schmerzerlebnis

Die aufsteigenden Bahnen im Tractus spinothalamicus aktivieren nozizeptive Neurone in Thalamus und Kortex. Dies ist eine Grundvoraussetzung für das bewusste Schmerzerleben (Schaible & Schmidt, 1995). Handwerker (2001) beschreibt drei unterschiedliche Komponenten der bewussten Schmerzwahrnehmung, an der verschiedene Hirnareale beteiligt sind:

- Sensorisch-diskriminative Komponente: Die Wahrnehmung der Reizintensität sowie die Lokalisierung von Schmerzreizen werden mittels Projektion über den ventrobasalen Thalamuskern in die somatosensorischen Projektionsfelder

(Kortexareale S I und S II) des Gyrus postcentralis und in Teile des limbischen Systems vermittelt.

- Affektive Schmerzkomponente: Schmerzreize als Alarmsignale haben in der Regel einen Aktivierungseffekt, welcher durch Projektionen in die Formatio reticularis des Hirnstammes und durch retikuläre Projektionen zur Hirnrinde vermittelt wird. Außerdem lösen Schmerzreize, vor allem durch Projektionen in das limbische System, emotionale Reaktionen wie Angst oder Unlust aus.
- Kognitiv-evaluative Schmerzkomponente: Die Fähigkeit, Schmerzen zu bewerten (z. B. als harmlos oder bedrohlich), setzt unterschiedliche Lernprozesse voraus, für die der frontale Kortex eine entscheidende Rolle spielt.

2.4 Endogene Hemmung

Im zentralen Nervensystem existieren zahlreiche Hemmungssysteme mit der Funktion, die Sensibilität und Reaktionsbereitschaft verschiedener funktioneller Systeme auf ein adäquates Niveau zu regulieren. So wird das nozizeptive System kontinuierlich auf allen Ebenen inhibitorisch kontrolliert. Es gibt verschiedene experimentelle und klinische Hinweise darauf, dass eine verminderte Funktion eines inhibitorischen Systems, z. B. durch Mangel an inhibitorischem Transmitter, eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit zur Folge haben kann. Dies kann die Entstehung chronischer Schmerzen begünstigen. Durch schmerztherapeutische Maßnahmen können Hemmungssysteme unterstützt werden (Zimmermann, 1993).

Für die endogene Schmerzhemmung spielen neben inhibitorischen Transmittern (z. B. GABA, Serotonin oder Noradrenalin) die endogenen Opioide eine zentrale Rolle. Diese binden an denselben Membranrezeptoren nozizeptiver Neurone, mit denen auch Morphin und andere für die Schmerztherapie wichtige, nicht-körpereigene Opiate reagieren. Zu den endogenen Opioiden zählen Endorphine, Enkephaline und Dynorphin.

Enkephalinerge und dynorphinerge Interneurone in den Laminae II und III des Hinterhorns und endorphinerge Neurone im Hirnstamm (v. a. im zentralen Höhlengrau des Mittelhirns) bewirken eine Hemmung der Schmerzübertragung. Andere absteigende schmerzhemmende Bahnen werden von serotoninerger und noradrenerger Neuronen im Hirnstamm gebildet.

Es sind unterschiedliche Mechanismen der endogenen Schmerzhemmung auf verschiedenen Ebenen bekannt (Handwerker, 2001; Zimmermann, 1993):

- segmentale Hemmung auf Rückenmarksebene: Reizung der dicken markhaltigen A β -Afferenzen über Mechanosensoren der Haut bewirkt über die Ausschüttung von inhibitorischen Transmittern eine Hemmung nozizeptiver Hinterhornneurone. In der Schmerztherapie macht man sich diesen Hemmmechanismus zunutze, indem z. B. durch elektrische Reizung von A β -Fasern (TENS = transkutane elektrische Nervenstimulation) Schmerzen gemildert werden. Dieser Mechanismus lässt sich im Experiment durch Ableitungen von Rückenmarksneuronen am narkotisierten Tier nachweisen (Zimmermann, 1984). Wiederholt man die Applikation eines Schmerzreizes nach vorhergehender, elektrischer Stimulation der A β -Fasern eines Hautnerven, löst der Schmerzreiz am Neuron eine geringere Entladungsfrequenz aus, als dies ohne vorherige A β -Reizung der Fall ist.
- Gegenirritation: die Reizung nozizeptiver Afferenzen aus anderen Körperregionen bewirkt eine Hemmung durch die Aktivierung inhibitorischer Neurone im Hirnstamm.
- Stressinduzierte Analgesie: Psychischer und physischer Stress führen zur Abnahme der Schmerzempfindlichkeit. Dies geschieht mittels Aktivierung der vom Hirnstamm ins Rückenmark absteigenden Hemmungssysteme und des endogenen Opioidsystems.
- absteigende Hemmung: eine zentrale Rolle für die körpereigene Schmerzbekämpfung ist die tonisch aktive, absteigende supraspinale Hemmung (Sandkühler, 2005). Erregende und hemmende Interneurone kontrollieren über prä- und postsynaptische Verbindungen das Erregungsniveau der aufsteigenden Neurone, wobei endogene Opiate und γ -Amino-Buttersäure (GABA) die wichtigsten hemmenden Transmitter darstellen (Meßlinger, 2002).

2.5 Veränderungen im nozizeptiven System bei Entzündung

2.5.1 Pathophysiologie der Entzündung

Die Literatur beschreibt *Entzündung* als Gegenreaktion des Gewebes auf eine Zell- bzw. Gewebsschädigung. Diese kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden (Buddecke & Fischer, 1992):

- physikalische Schäden (mechanische und thermische Schäden, Strahlung)
- chemische Substanzen (Zellgifte, starke Säuren und Basen)
- Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze)
- allergische Reaktionen (Antigen-Antikörper-Reaktionen)

Bei einer Entzündungsreaktion kommt es im Gewebe zum Anstieg von Entzündungsmediatoren. Diese werden entweder bei einer Gewebsschädigung freigesetzt (Bradykinin, Serotonin) oder vermehrt gebildet (Prostaglandine, Leukotriene) und führen über ihre Wirkung an den Gefäßen (Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung) im Gewebe zu den klassischen Entzündungszeichen wie Schwellung, Schmerz, Überwärmung und Rötung (Schaible & Schmidt, 1995).

2.5.2 Periphere Sensibilisierung

Im gesunden Gewebe besitzen nozizeptive Primärafferenzen eine hohe Erregungsschwelle für mechanische und thermische Reize. Zusätzlich gibt es „stille“ bzw. „schlafende“ Nozizeptoren, welche unter Normalbedingungen nicht aktivierbar sind.

Unter entzündlichen Bedingungen kommt es im Gewebe zu einer Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z. B. Prostaglandin, Bradykinin, Histamin, Adenosintriphosphat (ATP) und anderen. Diese bewirken im Gewebe die Entwicklung klassischer Entzündungszeichen wie Schwellung (durch Ausbildung eines Ödems aufgrund Erhöhung der Gefäßpermeabilität), Rötung (als Folge einer Vasodilatation) und Überwärmung. Des Weiteren können die Entzündungsmediatoren aber auch eine Sensibilisierung von nozizeptiven Primärafferenzen bewirken. Die Wirkung der Mediatoren auf die Nozizeptoren wird dabei über spezifische Membranrezeptoren auf den sensorischen Endigungen vermittelt, welche über second-messenger-Kaskaden entweder eine direkte Aktivierung der Nozizeptoren bewirken oder diese für andere Stimuli sensibilisieren (Schaible & Richter, 2004).

Die periphere Sensibilisierung resultiert in einer Absenkung der Erregungsschwelle der Nozizeptoren, einer Aktivierung „schlafender“ nozizeptiver Afferenzen sowie einer gesteigerten neuronalen Entladungsrate bei überschwelligem Reizen. Des Weiteren kann es bei den Nozizeptoren zum Auftreten von spontanen Entladungen kommen.

Primäre nozizeptive Afferenzen können aber auch selber zur Entzündung und damit zur Schmerzsteigerung beitragen: sie exprimieren Rezeptoren für Neurotrophine (Nerve Growth Factor = NGF), welche im Normalfall essentiell für die Entwicklung des Nervensystems

sind. Im entzündlichen Milieu wird die Konzentration von NGF im Gewebe erhöht, was einerseits direkt zu einer Mastzelldegranulation führt, andererseits wird über Bindung von NGF an Tyrosinkinase-A-Rezeptoren die Produktion von Neurokininen wie Substanz P oder Calcitonin gene-related peptide (CGRP) gesteigert. Die Freisetzung dieser Substanzen aus den sensorischen Endigungen führt im Gewebe zur Ausbildung einer „neurogenen Entzündung“, die unter anderem durch afferent erzeugte präkapilläre Vasodilatation, venoläre Plasmaextravasation, Mastzelldegranulation und Sensibilisierung weiterer Nozizeptoren gekennzeichnet ist (Schaible & Richter, 2004).

Die periphere Sensibilisierung führt also letzten Endes über die oben beschriebenen Mechanismen zur Schmerzsteigerung bzw. zum Auftreten von Ruheschmerzen.

2.5.3 Zentrale Sensibilisierung

Die Entzündung oder Verletzung von Gewebe führt neben der peripheren Sensibilisierung der Nozizeptoren oft zur zentralen Sensibilisierung. Diese äußert sich in gesteigerter Erregbarkeit spinaler Neurone (Woolf, 1983). Die übererregbaren Rückenmarksneurone reagieren empfindlicher auf periphere Reize und antworten verstärkt auf Stimulation. Die zentrale Sensibilisierung hat mehrere Effekte zur Folge: Zum einen lösen Reize in den geschädigten oder entzündeten Regionen eine verstärkte Antwort aus, zum anderen wird das rezeptive Feld, d. h. das Areal, aus welchem ein Rückenmarkneuron afferenten Einstrom erhält, größer. Zudem werden auch in Arealen mit intaktem Gewebe innerhalb des erweiterten rezeptiven Feldes durch nicht-noxische Reize nozizeptive Afferenzen aktiviert. Dieses Phänomen wird auch als sekundäre Hyperalgesie bezeichnet (Schaible & Richter, 2004).

In vielen Fällen dauert die zentrale Sensibilisierung nur so lange an, wie die entsprechenden Rückenmarksneurone nozizeptiven Einstrom von Afferenzen aus der Peripherie erhalten. Es kommt jedoch auch vor, dass die zentrale Sensibilisierung den peripheren Reiz überdauert (Schaible & Richter, 2004). Als ein möglicher Grund dafür kommt die so genannte „Langzeit-Potenzierung“ infrage, die sich durch den dauerhaften Anstieg der synaptischen Aktivität im Rückenmark äußert (Sandkühler & Liu, 1998). So könnten sich Schmerzzustände, die trotz Beseitigung des peripheren Schmerzprozesses anhalten, erklären lassen.

Zur Entstehung und Aufrechterhaltung zentraler Sensibilisierung tragen verschiedene Transmitter und Rezeptoren bei (Millan, 1999). Haupttransmitter zentraler nozizeptiver Neurone ist Glutamat, welches ionotrope NMDA (N-methyl-D-Aspartat)- und non-

NMDA-Rezeptoren sowie metabotrope Glutamat-Rezeptoren in Rückenmarksneuronen aktiviert. Bei leichter, nicht-noxischer Reizung kommt es durch Vermittlung von Glutamat zur Aktivierung von non-NMDA-Rezeptoren, wie z. B. α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren, was zum Natrium-Einstrom und damit zur Depolarisation der Zelle führt. Dies entspricht der basalen Antwort des Neurons. Erst durch noxische Reizung werden neben non-NMDA-Rezeptoren auch NMDA-Rezeptoren durch Glutamat aktiviert, was über starken Einstrom von Calcium eine second-messenger-Kaskade auslöst, welche zur Übererregbarkeit des Neurons führt. Unter normalen, d. h. nicht-noxischen Bedingungen, wird keine ausreichende Depolarisation erreicht, um die spannungsabhängige Blockade der NMDA-Kanäle durch Magnesiumionen zu lösen. Durch Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten (z. B. Ketamin) kann die zentrale Sensibilisierung verhindert und eine bereits existierende Übererregbarkeit abgeschwächt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung zentraler Sensibilisierung spielen (Neugebauer et al., 1993).

Neben den NMDA-Rezeptoren sind verschiedene Neuropeptide, die bei peripherer Entzündung verstärkt freigesetzt werden (Substanz P, Neurokinin A, CGRP), in die zentrale Sensibilisierung involviert. Die Neuropeptide wirken an Rezeptoren, die von vielen Rückenmarkneuronen exprimiert werden, und führen ebenfalls zur gesteigerten spinalen Erregbarkeit. Die spinale Applikation von Antagonisten an den Rezeptoren dieser Substanzen schwächt die Entwicklung einer entzündungs-induzierten spinalen Übererregbarkeit ab (Schaible & Richter, 2004).

Eine besondere Rolle kommt bei den oben genannten Vorgängen den Prostaglandinen zu, auf die im nächsten Kapitel gesondert eingegangen wird.

2.6 Prostaglandine

Prostaglandine, 1930 erstmals von dem schwedischen Mediziner und Neurochemiker Ulf von Euler im menschlichen Sperma nachgewiesen, gehören neben Thromboxanen und Leukotrienen zur Gruppe der Eicosanoide (griech. *eicosa* = zwanzig), und sind Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie v. a. der Arachidonsäure. Sie kommen im ZNS und den meisten tierischen Geweben vor, wo sie ihre Wirkung als lokale Mediatoren mit vielfältigen Funktionen ausüben (Löffler, 2003).

2.6.1 Synthese der Prostaglandine

Prostaglandine liegen nicht in gespeicherter Form vor, sondern werden bei Aktivierung der Zellen (z. B. durch mechanisches Trauma oder Entzündung) aus Arachidonat neu synthetisiert (Funk, 2001). Durch das Enzym Phospholipase A₂ werden aus Membranphospholipiden ungesättigte Fettsäuren freigesetzt, darunter auch Arachidonsäure. Durch die Wirkung der Isoenzyme COX-1 und COX-2 der Cyclooxygenase wird Arachidonsäure in Prostaglandin G₂ (PGG₂) umgewandelt, welches anschließend durch Peroxidase zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert wird, das die Muttersubstanz der Prostaglandine D₂, E₂, F₂, und I₂ darstellt (Löffler, 2003; Vasquez et al., 2001). Die Prostaglandine und Thromboxane werden auch zur Gruppe der Prostanoiden zusammengefasst (Narumiya et al., 1999) (siehe Abbildung 2.4).

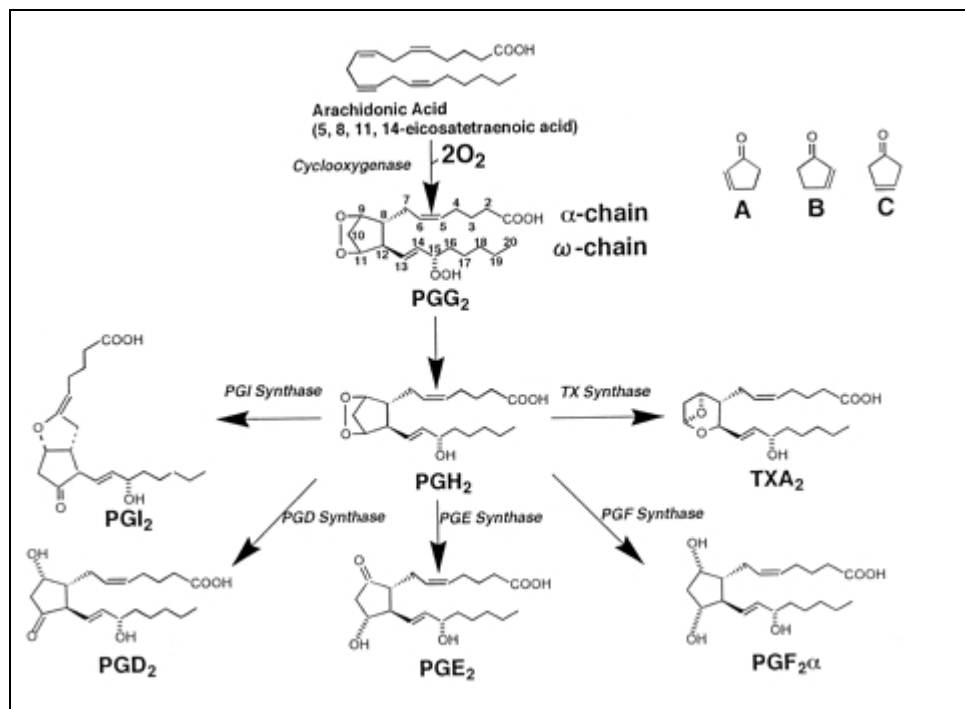


Abbildung 2.4: Synthese der Prostanoiden (Quelle: Narumiya et al., 1999)

2.6.2 Prostaglandine im Rückenmark

Bei Verletzung oder Entzündung von Gewebe kommt es in der Peripherie durch Wirkung der Cyclooxygenase zur Synthese von Prostaglandin, welches über die Aktivierung spezieller Rezeptoren Nozizeptoren sensibilisiert. Es resultiert eine Absenkung der Reizschwelle, was in der betroffenen Gewebsregion zur (primären) Hyperalgesie führt. Es wurde lange angenommen, dass die analgetische Wirkung der COX-Hemmer aus der

Gruppe der non-steroidalen Antirheumatika (NSAR) in erster Linie über die Hemmung der Prostaglandinsynthese in der Peripherie vermittelt wird (Baba et al., 2001). Erst in jüngerer Zeit konnte bewiesen werden, dass PGE_2 nach peripherer Verletzung bzw. Entzündung auch im Rückenmark synthetisiert wird (Dirig & Yaksh, 1999; Samad et al., 2001) und dort an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (siehe unten) auf intrinsischen spinalen und primär afferenten Neuronen bindet. Über Aktivierung von cAMP und Proteinkinase A öffnen Prostaglandine Tetrodotoxin (TTX)-resistente Natriumkanäle, hemmen spannungsgesteuerte Kaliumkanäle und steigern den spannungsabhängigen Calciumeinstrom in den nozizeptiven Afferenzen und damit auch deren zentralen Endigungen im Rückenmark. Dies führt zur Senkung der Erregungsschwelle, Steigerung der Antwortrate und Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren, Substanz P, CGRP und NO (Vanegas & Schaible, 2001) und damit zur zentralen Sensibilisierung der Rückenmarkneurone (Baba et al., 2001). Es gelang der Nachweis von COX-1 und COX-2 und einer basalen Produktion von PGE_2 in Hinterwurzelganglien und im Rückenmark (Vanegas & Schaible, 2001). Obwohl beide Isoformen der COX im Rückenmark vorhanden sind, wird bei peripherer Entzündung insbesondere die COX-2 hochreguliert (Beiche et al., 1996, 1998a, b), was zur gesteigerten Synthese von PGE_2 im Rückenmark führt (Baba et al., 2001). Neben peripherer Entzündung kann man auch bei anderen noxischen Reizen (Hitze, Stromschläge, subcutane Formalininjektion) eine verstärkte PGE_2 -Bildung im Rückenmark beobachten (Vasquez et al., 2001). Zudem führt die intrathekale Gabe von PGE_2 bei wachen Tieren zu Allodynie und Hyperalgesie (Uda et al., 1990; Minami et al., 1994).

Beide Effekte, sowohl der spinale Anstieg von PGE_2 bei peripherer Entzündung als auch die konsekutive Hyperalgesie nach intrathekaler PGE_2 -Gabe können durch spinale Gabe von NSAR (z. B. Indometacin) abgeschwächt werden (Baba et al., 2001). Die NSAR verhindern die Prostaglandinsynthese folglich nicht nur im peripheren Gewebe, sondern auch im Rückenmark (Vanegas & Schaible, 2001).

2.7 Die Prostanoid-Rezeptoren

Die Gruppe der Prostanoiden besteht aus den Prostaglandinen D_2 , E_2 , F_2 und I_2 , sowie dem Thromboxan A_2 . Da die Prostanoiden aus Fettsäuren gebildet werden und hydrophob sind, ging man längere Zeit davon aus, dass sie entweder durch Zellmembranen dringen oder

von diesen inkorporiert werden würden, um dann ihre Wirkungen durch Veränderungen des Fließgleichgewichts auszuüben (Narumiya et al., 1999). Bito (1972) wies jedoch nach, dass Prostanoiden weder von Zellmembranen aufgenommen werden, noch diese durchdringen (Bito, 1972). Mittels Bioassay-Untersuchungen wurden die Wirkungen von Prostanoiden und synthetischen Analoga auf verschiedene Gewebe untersucht. Hier zeigte jedes Prostanoid ein individuelles Wirkungsprofil, was darauf hinweist, dass jedes Prostanoid seine Wirkung an einem spezifischen Ort ausübt. So entstand die Vorstellung von unterschiedlichen, spezifischen Prostanoid-Rezeptoren in verschiedenen Geweben (Pickles, 1967; Andersen et al., 1980; Gardiner & Collier, 1980). Kennedy et al. (1982) unternahmen erste Versuche, die Prostanoid-Rezeptoren zu klassifizieren. Mithilfe radioaktiv markierter Prostanoidderivate wurden in vielen verschiedenen Geweben und Zellen spezifische, hochaffine Bindungsstellen für Prostanoiden gefunden (Kuehl, 1972; Narumiya, 1999). Ab den späten 70er Jahren wurden verschiedene synthetische Thromboxan A₂-Agonisten und -Antagonisten entwickelt, mit deren Hilfe ein für Thromboxan A₂ spezifischer Rezeptor identifiziert werden konnte (Jones et al., 1982).

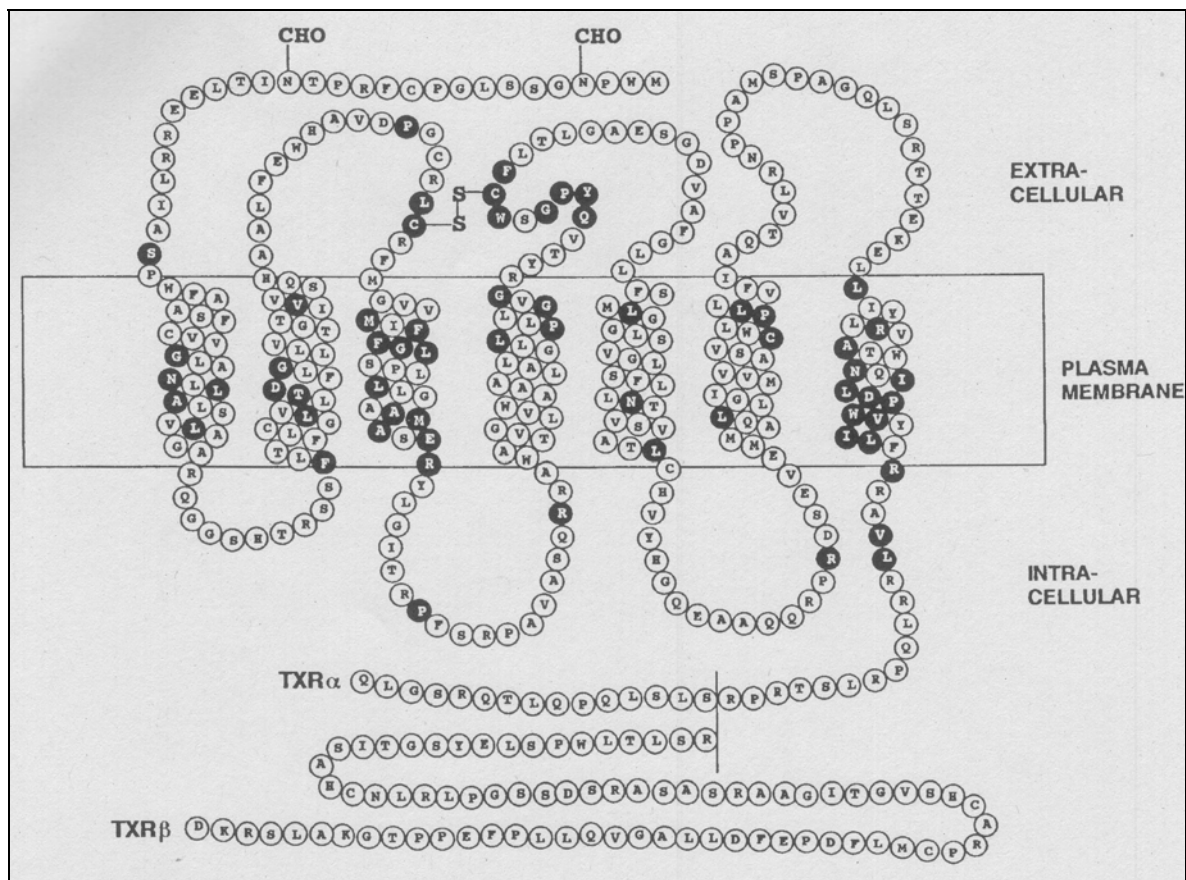


Abbildung 2.5: Struktur des TxA₂-Rezeptors im humanen Gewebe (Quelle: Narumiya et al., 1999)

Dieser besitzt wie alle Prostanoidrezeptoren ähnlich wie das Sehpigment Rhodopsin sieben Transmembrandomänen, die an verschiedene G-Proteine (G_s , G_i) gekoppelt sind (siehe Abbildung 2.5), deshalb spricht man auch von Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ. Die Wirkung von Prostanoiden an ihren spezifischen Rezeptoren ist mit intrazellulären Änderungen von *second messenger*-Konzentrationen verbunden. Je nach Rezeptortyp kommt es zu einer Hemmung bzw. Stimulierung der Adenylatzyklase mit nachfolgender Ab- oder Zunahme des cAMP-Spiegels. Andere Prostanoidrezeptoren wiederum beeinflussen durch ihre Aktivierung den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel über den Phosphatidylinositolzyklus (Butcher & Sutherland, 1967; Löffler, 2003). Um die Wirkungen der einzelnen Prostanoid-Rezeptoren zu beschreiben, wurden in verschiedenen Studien Cyclooxygenase-Hemmer und verschiedene Prostanoidanaloga mit agonistischen und antagonistischen Wirkungen eingesetzt. Coleman et al. (1990) schlugen eine umfassende Einteilung der Prostanoidrezeptoren vor. Sie gingen von spezifischen Rezeptoren für Thromboxan (Tx) und die Prostaglandine D, E, F und I aus und benannten diese Rezeptoren entsprechend TP, DP, EP, FP und IP. Die für diese Arbeit relevanten EP-Rezeptoren wurden des Weiteren in die Subtypen EP₁, EP₂, EP₃ und später noch EP₄ unterteilt, die alle durch das natürliche Prostaglandin E₂ aktiviert werden können, aber bei verschiedenen anderen Agonisten unterschiedliche Wirkungen zeigen (Narumiya et al., 1999; Vanegas & Schaible, 2001).

Obwohl die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen, dass Prostanoidrezeptoren in vielen Geweben und Organen des Körpers vorkommen, konnte bis dato noch nicht vollständig geklärt werden, wie die Rezeptoren genau verteilt sind bzw. welche Zellen im Einzelnen welche Rezeptoren exprimieren. Dies liegt zum einen an der insgesamt relativ geringen Zahl der Prostanoidrezeptoren, und zum anderen daran, dass in den einzelnen Geweben eine sehr große Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptoren vorherrscht, die es schwierig macht, einzelne Rezeptorentypen nachzuweisen. Erst mittels moderner Techniken wie Northern-blot-Analyse oder in-situ-Hybridisierung konnten exaktere Informationen über die Lokalisierung einzelner Prostanoid-Rezeptoren gewonnen werden (Narumiya et al., 1999).

In dieser Arbeit soll im Folgenden intensiver auf die einzelnen EP-Rezeptoren und ihre Rolle bei der Entwicklung einer spinalen Übererregbarkeit eingegangen werden.

2.8 Die EP-Rezeptoren

Es gibt vier Haupttypen von Rezeptoren für PGE₂: EP₁, EP₂, EP₃ und EP₄, wobei sich der EP₃-Rezeptor in weitere Untergruppen einteilen lässt (EP_{3α}, EP_{3β}, EP_{3γ}). Die EP-Rezeptoren entfalten ihre Wirkung auf unterschiedliche Weise:

- Die Aktivierung des EP₁-Rezeptors bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration über die Öffnung eines Calcium-Kanals mit nachfolgendem Einstrom von Ca²⁺ von extra- nach intrazellulär. Dies bewirkt z. B. eine Kontraktion glatter Muskulatur sowie eine verstärkte Freisetzung von Neurotransmittern.
- Die EP₂- und EP₄-Rezeptoren sowie einige Subtypen des EP₃-Rezeptors (EP_{3β} und EP_{3γ}) sind an ein G_s-Protein gebunden und vermitteln eine Stimulation der Adenylatzyklase, was zu einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel führt. Dies führt unter anderem zur Relaxierung glatter Muskulatur.
- Der EP_{3α}-Rezeptor bewirkt via G_i-Protein eine Hemmung der Adenylatzyklase mit resultierender Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Narumiya et al., 1999; Vanegas & Schaible, 2001).

Für diese Arbeit besonders relevant ist, dass neben ihrem Vorkommen in vielen anderen Organen und Geweben, alle vier EP-Rezeptor-Subtypen auch im Rückenmark nachgewiesen werden konnten (Donaldson et al., 2001). Es ist daher von beträchtlichem Interesse, ihren Einfluss auf die PGE₂-vermittelte, spinale Übererregbarkeit zu erforschen (Narumiya et al., 1999; Bär et al., 2004).

EP₁-, EP₃- und EP₄-Rezeptoren werden in Hinterwurzel-Ganglien (*Dorsal Root Ganglia* = DRG) exprimiert (Sugimoto et al., 1994; Oida et al., 1995; Beiche et al., 1998a). Dies deutet auf eine Beeinflussung der Transmitterfreisetzung von primär afferenten Fasern durch Prostaglandine hin (Bär et al., 2004). EP₂-Rezeptoren hingegen finden sich postsynaptisch auf Rückenmarksneuronen (Kawamura et al., 1997), folglich sind auch hier Wirkungen von PGE₂ zu erwarten (Baba et al., 2001; Ahmadi et al., 2002). In jüngerer Zeit konnten jedoch von Matsumoto et al. (2005) sowie unserer eigenen Arbeitsgruppe EP₂-Rezeptoren auch präsynaptisch auf den DRG-Neuronen nachgewiesen werden.

2.8.1 EP₁-Rezeptoren

EP₁-Rezeptoren finden sich in 30% aller DRG-Neurone (Oida et al., 1995). In einigen Neuronen geht die Expression von EP₁-Rezeptor-mRNA mit Co-Expression von IP-Rezeptor-mRNA einher (Vanegas & Schaible, 2001). Die Aktivierung des EP₁-Rezeptors ist mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) verbunden.

Für uns von Interesse war die Studie von Nakayama et al. (2002), in der Untersuchungen an Ratten mit einer durch Carrageenan-Injektion induzierten Entzündung der hinteren Pfote durchgeführt wurden. Es wurden die Effekte des intrathekal applizierten, spezifischen EP₁-Antagonisten ONO-8711 auf die entzündungsbedingte mechanische Hyperalgesie und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration untersucht. In dieser Studie kam es nach lang anhaltender Entzündung (15h nach Carrageenan-Injektion) zum Anstieg von [Ca²⁺]_i und zur mechanischen Hyperalgesie. Durch gleichzeitige intrathekale Gabe des selektiven EP₁-Rezeptor-Antagonisten ONO-8711 wurden nicht nur der Anstieg von [Ca²⁺]_i sondern auch die mechanische Hyperalgesie unterdrückt. Dies spricht für eine Beteiligung des EP₁-Rezeptors an der Entstehung der durch Entzündung induzierten und durch Ausschüttung von PGE₂ vermittelten zentralen Sensibilisierung. Des Weiteren wiesen Nakayama et al. (2002) einen durch intrathekale Applikation von PGE₂ ausgelösten Anstieg von [Ca²⁺]_i in Neuronen der Laminae II und V des Rückenmarks nach. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass EP₁-Rezeptoren nicht nur präsynaptisch auf den primär afferenten Fasern exprimiert werden, sondern auch postsynaptisch in oberflächlichen und tiefen Schichten des Rückenmarks vorkommen (Nakayama et al., 2002). Minami et al. (2001) führten Untersuchungen an genetisch veränderten Knockout-Mäusen durch, bei denen entweder die EP₁-Rezeptor-mRNA bzw. die EP₃-Rezeptor-mRNA ausgeschaltet wurden. Intrathekale Gabe von PGE₂ führte bei Mäusen mit fehlendem EP₃-Rezeptor zur Ausbildung mechanischer Allodynie, was bei den Mäusen mit fehlenden EP₁-Rezeptoren jedoch nicht möglich war. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass der EP₁-Rezeptor an der Entwicklung der durch PGE₂ induzierten mechanischen Allodynie beteiligt ist (Minami et al., 2001).

Die Aktivierung von EP₁-Rezeptoren mit resultierender [Ca²⁺]_i-Erhöhung spielt also eine Rolle für die entzündungs-induzierte Entwicklung zentraler Sensibilisierung sowie für die Entstehung von PGE₂-vermittelter mechanischer Allodynie.

2.8.2 EP₂-Rezeptoren

Der EP₂-Rezeptor besteht aus 358 Aminosäuren und kann an verschiedenen Orten im Körper nachgewiesen werden, wie z. B. Milz, Uterus oder Lunge (Regan et al., 1994). Die mRNA von EP₂-Rezeptoren wurde außerdem in postsynaptischen Neuronen und Endothelialzellen der Laminae I und II des Rückenmarks gefunden (Kawamura et al., 1997), was auf postsynaptische Effekte von PGE₂ hindeutet (Baba et al., 2001; Ahmadi et al., 2002). Die Zellen mit der höchsten Rezeptordichte finden sich in Hinter- und Vorderhorn des Rückenmarks (Vanegas & Schaible, 2001). Der EP₂-Rezeptor entfaltet seine Wirkung via G_s-Protein-Kaskade und führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase, was sich in einer Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels äußert (Narumiya et al., 1999). Die Gabe von Butaprost, einem relativ EP₂-selektiven synthetischen PGE₂-Derivat, erzeugt bei Mäusen in Dosen von über 50 ng/kg KG Hyperalgesie (Minami et al., 1994), was darauf hindeutet, dass der EP₂-Rezeptor ebenfalls an der Entstehung PGE₂-induzierter Hyperalgesie beteiligt ist.

2.8.3 EP₃-Rezeptoren

Die EP₃-Rezeptoren lassen sich in mehrere Isoformen unterteilen, deren Struktur und Anzahl sich bei den verschiedenen Spezies unterscheidet. Bei Ratten wurden bisher drei Varianten des EP₃-Rezeptors identifiziert. Diese werden als EP_{3α} (EP_{3A}), EP_{3β} (EP_{3B}) und EP_{3γ} (EP_{3C}) bezeichnet (Narumiya et al., 1999; Donaldson et al., 2001). Die einzelnen EP₃-Rezeptor-Varianten unterscheiden sich sowohl in der Aminosäuresequenz des intrazellulären Rezeptorabschnittes als auch in der Signal-Transduktions-Kaskade (Donaldson et al., 2001). In erster Linie vermitteln die EP₃-Rezeptoren über Inhibierung der Adenylatzyklase einen cAMP-Abfall (Sugimoto et al., 1992; Narumiya et al., 1999; Vanegas & Schaible, 2001), einzelne Varianten können jedoch abhängig von der Konzentration des Agonisten auch einen cAMP-Anstieg oder die Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration induzieren (Negishi et al., 1995; Narumiya et al., 1999). Die mRNA von EP₃-Rezeptoren findet sich in ca. 50% der DRG-Neurone aller Größen, jedoch nicht in Gliazellen (Sugimoto et al., 1994; Oida et al., 1995). Des Weiteren wurde die mRNA von EP₃-Rezeptoren in den Laminae I, II und V des Rückenmarks nachgewiesen (Beiche et al., 1998a). Minami et al. (2001) führten Studien an genetisch veränderten Knockout-Mäusen durch, denen aufgrund eines künstlich erzeugten Gendefekts entweder die EP₁-Rezeptoren bzw. die EP₃-Rezeptoren fehlten. Die selektive Aktivierung des EP_{3α}-Rezeptors mittels intrathekaler Applikation des EP_{3α}-Rezeptor-

Agonisten ONO-AE-248 in Konzentrationen von 500 pg/kg KG und mehr führte bei Mäusen mit vorhandenem EP₃-Rezeptor zur Ausbildung einer Hyperalgesie. Bei Knockout-Mäusen mit fehlendem EP₃-Rezeptor zeigte die Applikation von ONO-AE-248 keinen Effekt. Die intrathekale Gabe von PGE₂ in verschiedenen Dosen erzeugte bei normalen Mäusen Hyperalgesie in niedrigen sowie hohen Dosen. Bei Knockout-Mäusen mit fehlendem EP₃-Rezeptor wurde durch PGE₂ Hyperalgesie dagegen nur in hohen Dosen ausgelöst. Allodynie konnte durch intrathekale PGE₂-Applikation zwar bei Knockout-Mäusen mit fehlendem EP₃-Rezeptor induziert werden, jedoch nicht bei Mäusen mit fehlendem EP₁-Rezeptor. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass PGE₂ in niedrigen Dosen zu EP₃-Rezeptor-vermittelter Hyperalgesie führt (Minami et al., 1994, 2001).

2.8.4 EP₄-Rezeptoren

Der Wirkmechanismus des EP₄-Rezeptors ist vergleichbar mit dem des EP₂-Rezeptors: Seine Aktivierung führt zu einer Stimulation der Adenylatzyklase und einem daraus resultierenden intrazellulären cAMP-Anstieg (Narumiya et al., 1999; Vanegas & Schaible, 2001). Man findet EP₄-Rezeptoren ähnlich wie EP₂-Rezeptoren in vielen verschiedenen Geweben, wie z. B. in Uterus, Milz oder Lunge. Der EP₄-Rezeptor ist darüber hinaus auch in Dünndarm, Niere, Pankreas und Leukozyten präsent, außerdem wird ihm eine Schlüsselrolle beim Verschluss des Ductus arteriosus bei der Geburt zugeordnet (Nguyen et al., 1997). Des Weiteren wurde die mRNA von EP₄-Rezeptoren in mehr als 20% aller Hinterwurzelganglien-Neurone (DRG-Neurone) nachgewiesen (Regan et al., 1994; Oida et al., 1995). Zum jetzigen Zeitpunkt sind auf dem Markt noch keine spezifischen EP-Rezeptor-Antagonisten erhältlich, um EP₂- von EP₄-Rezeptoren zu unterscheiden. Obwohl sich EP₂- und EP₄-Rezeptoren hinsichtlich Wirkmechanismus und Affinität zu PGE₂ ähneln, bestehen doch deutliche strukturelle Unterschiede. Im Gegensatz zum EP₂-Rezeptor mit seinen 358 Aminosäuren und den relativ kurzen intrazellulären Schleifen und C-terminalen Endigungen besteht der EP₄-Rezeptor aus 488 Aminosäuren und besitzt eine lange, dritte intrazelluläre Schleife und einen langen zytoplasmatischen Ausläufer (An et al., 1993). Der EP₄-Rezeptor desensibilisiert unter Einfluss von Agonisten im Gegensatz zum EP₂-Rezeptor bereits innerhalb von Minuten (Nishigaki et. al, 1996; Bastepe & Ashby, 1997, 1999). Dies führt zu dem Schluss, dass über den EP₄-Rezeptor rasch abklingende Ereignisse vermittelt werden, während der EP₂-Rezeptor anhaltende PGE₂-Wirkung vermittelt (Desai et al., 2000).

2.9 Ziele dieser Arbeit

Der genaue Einfluss von Prostaglandinen im Rückenmark auf das nozizeptive System ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Unter entzündlichen Bedingungen, wie sie z. B. bei einer chronischen Gelenkentzündung vorherrschen, kommt es zu einer verstärkten Synthese und Ausschüttung von Prostaglandin E_2 im Rückenmark. In verschiedenen Studien konnte jedoch PGE_2 auch unter normalen, d. h. nicht-entzündlichen Bedingungen im Rückenmark von Ratten nachgewiesen werden (Coderre et al., 1990; Malmberg & Yaksh, 1995 a, b; Yang et al., 1996 a, b; Willingale et al., 1997; Hua et al., 1999). Die Wirkung von PGE_2 wird im Rückenmark über die vier spezifischen Rezeptoren EP_1 , EP_2 , EP_3 und EP_4 vermittelt, und führt zu einer Steigerung der neuronalen Erregbarkeit, was in einer Herabsetzung der Reizschwelle sowie einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes von nozizeptiven Neuronen resultiert. Das Vorhandensein von mindestens vier unterschiedlichen Rezeptoren für eine einzelne Substanz (PGE_2) lässt vermuten, dass die verschiedenen EP-Rezeptoren unterschiedliche PGE_2 -Wirkungen vermitteln. Um hierzu genauere Schlüsse ziehen zu können, war eine selektive Untersuchung der Funktionen der unterschiedlichen EP-Rezeptoren erforderlich.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden bei anästhesierten Ratten extrazelluläre *in-vivo*-Ableitungen von nozizeptiven Hinterhornneuronen mit Hauptafferenzen aus dem Kniegelenk durchgeführt. Dann wurde je einer der vier EP-Rezeptoren mittels Applikation eines selektiven Agonisten aktiviert und so der Einfluss eines bestimmten EP-Rezeptors auf das Antwortverhalten nozizeptiver Afferenzen untersucht. Die selektiven Untersuchungen der einzelnen EP-Rezeptoren wurden in unserem Fall unter normalen, d.h. nicht-entzündlichen Bedingungen durchgeführt, um eine unselektive Aktivierung aller EP-Rezeptoren durch das im Rahmen einer Entzündung vermehrt ausgeschüttete Prostaglandin E_2 zu verhindern.

Für die Versuche wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- Führt die selektive Aktivierung einzelner EP-Rezeptoren bei normalen Ratten zu einem veränderten Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone?
- Was bewirkt die selektive Aktivierung eines EP-Rezeptorsubtyps hinsichtlich Reizschwelle, Entladungsrate und Ausdehnung des rezeptiven Feldes eines nozizeptiven Neurons?

- Über welche EP-Rezeptoren bewirkt PGE₂ eine spinale Übererregbarkeit, welche zur Schmerzzunahme führt?

Die Untersuchung der oben formulierten Fragestellungen soll als Grundlage für weiterführende Untersuchungen des nozizeptiven Systems dazu beitragen, genauere Erkenntnisse über die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen EP-Rezeptortypen zu erhalten. Das hier gewonnene Wissen könnte dazu dienen, potente Medikamente gegen PGE₂-induzierte (Entzündungs-)Schmerzen zu entwickeln.

3 Material und Methoden

3.1 Die Testsubstanzen

Da zum Untersuchungszeitpunkt keine spezifischen Antagonisten für die einzelnen EP-Rezeptoren auf dem Markt erhältlich waren, wurden für das vorliegende Experiment vier verschiedene, spezifische EP-Agonisten verwendet, wobei während eines Experiments immer nur eine einzige Substanz in verschiedenen Konzentrationen verwendet wurde.

Im Folgenden folgt eine genaue Auflistung der in den Experimenten verwendeten Substanzen:

EP₁-Agonist: ONO-DI-004 ((17S)-2,5-Ethano-6-Oxo-17,20-Dimethyl-PGE₁)

(Ono Pharmaceutical, Osaka, Japan)

- Lösungsmittel: 0,5% Dimethylsulfoxid (DMSO) in 0,9% Kochsalzlösung (NaCl)
- K_i-Wert (Herstellerangabe): 0,15 µM
- EC₅₀: 0,42 µM
- verwendete Konzentrationen:
 - o 0,1 ng/µl (2,36 µM)
 - o 1 ng/µl (23,6 µM)
 - o 10 ng/µl (236 µM)
 - o 100 ng/µl (2,36 mM)

EP₂-Agonist: Butaprost ((±)-15-deoxy-16S-hydroxy-17-cyclobutyl-PGE₁)

(Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)

- Lösungsmittel: Tyrode
- K_i-Wert (Herstellerangabe): 0,073µM
- EC₅₀: 5 µM
- verwendete Konzentrationen:
 - o 0,1 ng/µl (2,44 µM)
 - o 1 ng/µl (24,4 µM)
 - o 10 ng/µl (244 µM)
 - o 100 ng/µl (2,44 mM)

EP₃-Agonist: ONO-AE-248 (11, 15-O-Dimethyl-PGE₂)

(Ono Pharmaceutical, Osaka, Japan)

- Lösungsmittel: 5% DMSO in 0,9% NaCl
- K_i-Wert (Herstellerangabe): 0,0075 μM
- EC₅₀: 0,0052 μM
- verwendete Konzentrationen:
 - 1 ng/μl (26,28 μM)
 - 10 ng/μl (262,8 μM)
 - 100 ng/μl (2,628 mM)

EP₄-Agonist: ONO-AE1-329 (16-(3-Methoxymethyl)phenyl-ω-tetranor-3,7-Dithia-PGE₁)

(Ono Pharmaceutical, Osaka, Japan)

- Lösungsmittel: 5% DMSO in 0,9% NaCl
- K_i-Wert (Herstellerangabe): 0,0097 μM
- EC₅₀: 0,0031 μM
- verwendete Konzentrationen:
 - 1 ng/μl (21,9 μM)
 - 10 ng/μl (219 μM)
 - 100 ng/μl (2,19 mM)

Die Konzentration der Stammlösungen betrug bei allen vier Agonisten 1 mg / ml, alle weiteren Verdünnungen wurden mit reinem NaCl (EP₁, EP₃, EP₄) bzw. Tyrode (EP₂) durchgeführt.

Weitere Substanzen:

Prostaglandin E₂ (((5Z)-11α,13E,15S)-11,15-Dihydroxy-9-oxo-5,13-Prostadiensäure)

(Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)

- Lösungsmittel: 0,07% Ethanol in Tyrode
- K_i-Werte (Yamamoto et. al., 1999; Suzawa et al., 2000):
 - EP₁-Rezeptor: 0,018 μM
 - EP₂-Rezeptor: 0,038 μM
 - EP₃-Rezeptor: 0,005 μM
 - EP₄-Rezeptor: 0,0031 μM
- verwendete Konzentration: 100 ng/μl

Tyrode: 127,8 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 9mM CaCl, 2,1 mM MgCl, 9,8 mM NaHCO₃, 0,15 mM NaHCO₃ in aqua dest.

3.2 Versuchsvorbereitung

Zur Durchführung des Versuches waren einige Vorbereitungen notwendig, welche in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben werden.

3.2.1 Herstellung der Elektroden

Für die extrazellulären Ableitungen der Neurone wurden selbst angefertigte, glasisolierte Carbonfaserelektroden verwendet. Bei der Herstellung der Elektroden wurden zuerst vernickelte Kupferspitzen fest mit einem Goldstecker verlötet. An die Kupferspitzen wurde nun eine ca. 7 cm lange Carbonfaser mithilfe eines Silberleitlacks geklebt. Um die Carbonfaser zu isolieren, wurde über diese eine 10 cm lange Glaskapillare (Borosilikatglas, Typ 1103244, Hilgenberg, Malsfeld) geschoben und mit einem Zweikomponentenkleber am Goldstecker befestigt. Nun wurde die Glaskapillare in ein Elektrodenziehgerät (Nachbau: Narashige, Tokyo) gespannt (Geräteeinstellungen: Heizung: 48, Magnet: 30) und zu einer Elektrode gezogen, deren Spitzendurchmesser etwa 5 µm betrug. Danach musste noch die überstehende Carbonfaser abgeätzt werden, um den optimalen Widerstand (5-10 MΩ) zu erreichen. Hierzu wurde eine Lösung aus 0,1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) mit etwas Kaliumdichromat (K₂Cr₂O₇) versetzt, und so in ein Glasröhrchen gefüllt, dass ein konvexer Meniskus über das Ende des Röhrchens ragte. Nun wurde eine Spannung von 25-35 Volt angelegt und der Stromkreis geschlossen, indem das überstehende Ende der Carbonfaser unter dem Mikroskop (Carl Zeiss) an den Meniskus herangeführt wurde. Die Faser wurde so bis zum Glasansatz abgeätzt, dass nur noch eine kleine Spitze der Carbonfaser über die Glaskapillare hinausragte. Mit einem Impedanzmessgerät erfolgte eine Kontrolle des elektrischen Widerstandes der Elektrode. Nach einer optischen Qualitätsprüfung unter dem Mikroskop wurde die Carbonfaserelektrode in einen Mikrostepper (TC Elektronik SMS 87) eingespannt, mit dessen Hilfe man die Elektrode in µm-Schritten im Rückenmark des Versuchstieres vortreiben konnte.

3.2.2 Präparation der Ratte

Für die Experimente wurden 31 männliche Wistar-Ratten (200-350 g, Universität Jena) verwendet. Um die durch den Transport bedingten, äußeren Einflüsse auf die Tiere unmittelbar vor dem Versuch möglichst gering zu halten, wurden diese bereits einen Tag vor dem Experiment in das Labor gebracht.

Zur Narkoseeinleitung wurde dem Versuchstier initial eine Injektion von 85-115 mg/kg Körpergewicht Thiopental (Trapanal®, Byk Gulden, Konstanz) intraperitoneal (i. p.) verabreicht. Für das Experiment war es erforderlich, die Tiere unter Beibehaltung ihrer Spontanatmung für die gesamte Dauer des Versuches unter Narkose zu halten. Am Ende des Experiments wurden die Tiere durch eine i. v. Injektion Trapanal (ca. 100 mg) getötet.

Die erforderliche Narkosetiefe war erreicht, wenn die Tiere keinen Wegziehreflex am Bein mehr zeigten und außerdem kein Kornealreflex mehr auslösbar war. Falls die erste Dosis nicht ausreichte, bzw. die Narkosetiefe im Verlauf des Versuchs nachließ, wurden nach Bedarf additiv kleinere Dosen (20-50 mg/kg KG) Thiopental intraperitoneal substituiert.

Nach der Rasur der Tiere begann die Präparation mit einem Medianschnitt am Hals und der Freilegung der Trachea. Diese wurde zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet und ein Kunststofftubus eingeführt, an dessen Öffnung Sauerstoff geblasen wurde. Dies sollte den Tieren die Spontanatmung erleichtern.

Nun folgte auf einer Seite des Halses die Präparation der Arteria carotis communis sowie der Vena jugularis externa mithilfe eines Operationsmikroskops. Danach wurde ein mit Heparin-Tyrode (12,5 Einheiten Heparin in Tyrode) gefüllter Katheter in jedes der beiden Gefäße eingeführt und fixiert.

Über den arteriellen Katheter wurde der Blutdruck der Tiere überwacht. Der mittlere Druck betrug im Normalfall 90 – 120 mmHg. Ein Ansteigen des Blutdrucks während des Experiments ließ auf ein Nachlassen der Narkosetiefe schließen. In diesem Fall wurde erneut i. p. Thiopental verabreicht. Die Körpertemperatur der Tiere wurde über die ganze Versuchsdauer mittels eines Rückkopplungs-Kontroll-Systems, welches eine Heizdecke über einen rektalen Temperaturfühler steuerte, auf konstant 37 °C gehalten.

Nach der Anlage des Tracheostomas sowie der beiden Gefäßkatheter folgte der Verschluss des Halsschnittes mittels Klammern. Nun erfolgte ein medianer Hautschnitt über den Dornfortsätzen der Wirbelkörper L₁-L₄. Die paravertebrale Muskulatur wurde abpräpariert. Die Ratte wurde nun an Kopf und Schwanz in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Die Wirbelsäule wurde mit acht Schwanenhalsklammern, welche seitlich unter die Processi

transversi der freigelegten Wirbelkörper geschoben wurden, ebenfalls am Rahmen fixiert. Zudem wurden die Hautlappen entlang der Suture mit Fäden links und rechts am Rahmen befestigt.

Nun folgte unter dem Mikroskop die Laminektomie der Wirbel L₁-L₄ mit einer Knochenzange. Die Dura mater in den freigelegten Segmenten wurde unter dem Operationsmikroskop mit einer Vanna-Schere entfernt.

Das Rückenmark wurde während der Präparation ständig mit Tyrode feucht gehalten, um eine Austrocknung zu vermeiden. Um eine möglichst störungsarme Ableitung zu ermöglichen, wurde der stereotaktische Rahmen auf einem pneumatisch gesteuerten, schwingungsgedämpften Tisch befestigt, welcher unerwünschte Vibrationen minimieren sollte.

3.3 Versuchsaufbau

Die abgeleiteten Aktionspotentiale wurden mithilfe mehrerer Verstärker etwa um den Faktor 10^4 verstärkt. Hierzu dienten mehrere, in Reihe geschaltete Verstärker:

1. Ein Vorverstärker in direkter Nähe der Carbonfaserelektrode sowie ein Differentialverstärker mit etwa 10000-facher Verstärkung der Antwort (DAM 80-E, WPI, New Haven, USA)
2. Ein regelbarer Verstärker zur Feinregulierung der Amplitudengröße

Das Rohsignal hatte nach der Verstärkung eine Stärke von etwa 10 Volt erreicht, und wurde nun einerseits ungefiltert für die Auswertung auf einem PC aufgezeichnet (s. u.) und andererseits zu einem Hoch- und Tiefpassfilter geleitet, um den relevanten Frequenzbereich von 300-2000 Hertz einzugrenzen. Nach der Filterung wurden drei parallele Wege durchlaufen:

1. direkt nach dem Hoch- und Tiefpassfilter gelangte das Signal zu einem digitalen Speicheroszilloskop (Classic 6000, Gould), mit dessen Hilfe eine visuelle Echtzeitkontrolle der Aufzeichnung durchgeführt werden konnte.
2. über ein analoges Oszilloskop (HM305-2, Hameg Instruments, Frankfurt) erfolgte die Weiterleitung des Signals zu einem Fensterdiskriminator, der dazu diente, die Aufzeichnung auf Aktionspotentiale bestimmter Amplitude zu beschränken, um die Diskriminierung zwischen Rauschen und Signal zu erleichtern. Über ein

zwischengeschaltetes A/D-Interface (CED 1401, Science Park, Cambridge, England) erfolgte die zusätzliche Aufnahme in Form von Peri-Stimulus-Zeit-Histogrammen mittels des Programms m-rate an einem zweiten PC (M24, Olivetti). Dies diente einer weiteren visuellen Kontrolle der Aufnahme über die gesamte Dauer des Experiments, außerdem erhielt man so eine Sicherungskopie der Daten für die Offline-Auswertung.

3. Mithilfe eines Lautsprechers konnten die gefilterten Signale wahlweise gefenstert oder ungenfenstert (d. h. mit oder ohne Hintergrundrauschen) in Echtzeit akustisch kontrolliert werden.

Die endgültige Speicherung, Diskriminierung und Offline-Auswertung der Signale erfolgte mit der SPIKE / SPIDI-Software (Forster & Handwerker, 1990) am PC. Die Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Versuchsaufbau.

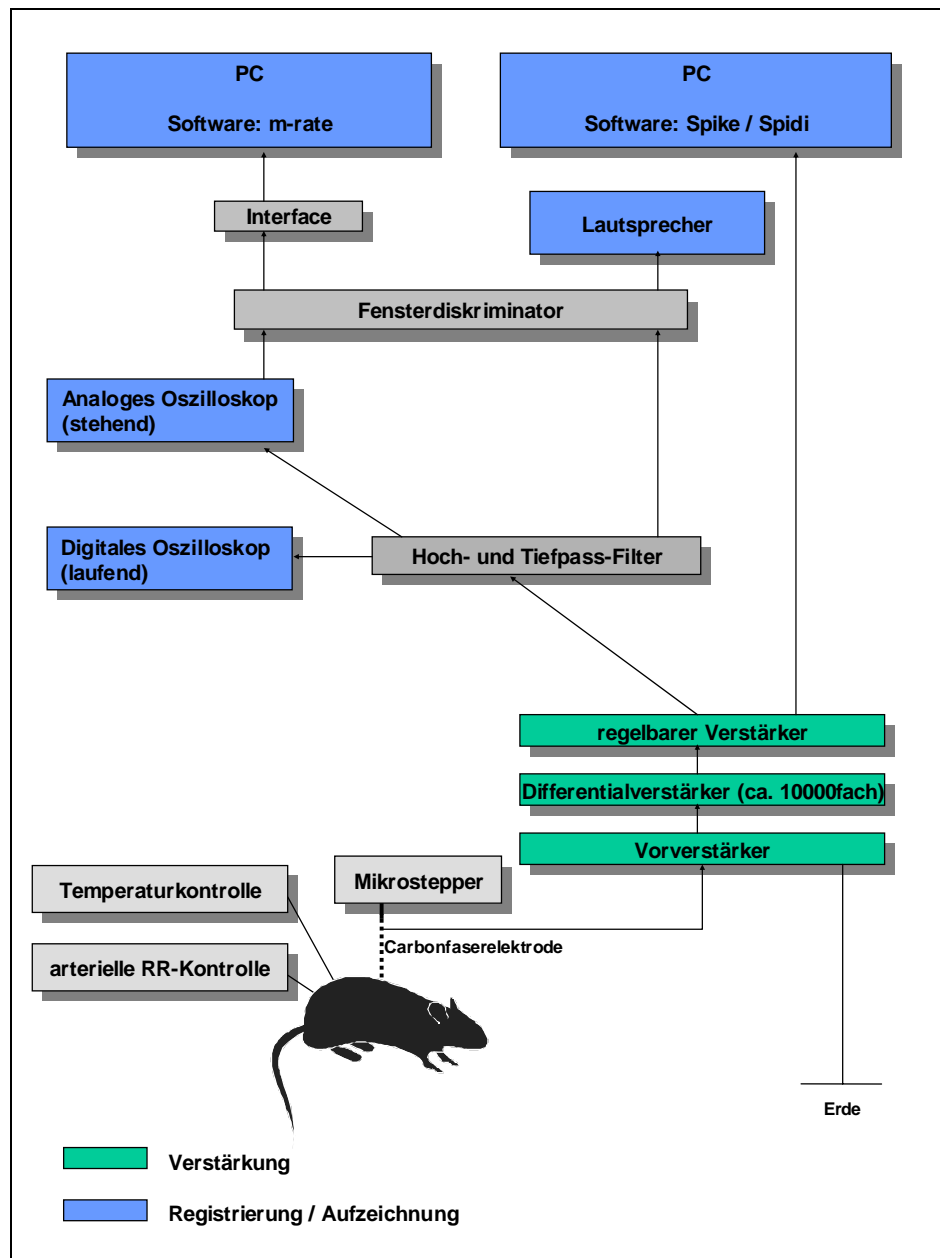


Abbildung 3.1: Schematischer Versuchsaufbau

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Suche nach einem geeigneten Neuron

Für die Durchführung des Experiments war es notwendig, im Hinterhorn des Rückenmarks ein Neuron mit sensiblen Afferenzen aus dem linken Kniegelenk zu finden. Zuerst musste jedoch die entsprechende Region des Rückenmarks gefunden werden, in der später die Ableitung erfolgen konnte. Hierzu wurde die Carbonfaserelektrode zwischen dem Sulcus medianus posterior und dem Eintritt der Hinterhornwurzeln unter mikroskopischer

Kontrolle manuell auf der Höhe L₁-L₄ auf das Rückenmark aufgesetzt. Nun wurde unter gleichzeitiger mechanischer Reizung des linken Kniegelenks die Elektrode mithilfe des Mikrosteppers schrittweise in das Rückenmark eingestochen (maximale Einstichtiefe ca. 1200 µm). Gleichzeitig erfolgte eine akustische und visuelle Kontrolle der abgeleiteten Aktionspotentiale. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis man die Höhe der Segmente abschätzen konnte, in der die sensiblen Afferenzen aus dem Knie in das Rückenmark eintraten. Auf Höhe der zur Ableitung bestimmten Region wurde ein ovaler Gummiring (ca. 3 x 5 mm) aufgesetzt und mit Silikongel abgedichtet. Somit entstand ein kleiner Trog (Pool) mit einem Fassungsvermögen von etwa 30 µl, in den später die zu untersuchenden Substanzen appliziert werden konnten. Das restliche Operationsfeld wurde mit flüssigem Agar (3% in Tyrode; Fluka, Deisenhofen) aufgefüllt, welches zum einen das Rückenmark gegen Bewegungsartefakte stabilisieren sollte und zum anderen den Gummitrog gegen das Auslaufen von Flüssigkeit versiegelte. Der Pool wurde mit Tyrode gefüllt, um ein Austrocknen des Rückenmarks zu verhindern.

Nun wurde die Elektrode mit dem Mikrostepper wieder in das Rückenmark gesenkt, um ein geeignetes Neuron zu finden, welches verschiedenen Auswahlkriterien gerecht werden musste:

- Das Neuron sollte nur Afferenzen aus der Tiefe des Gelenks führen (Synovialspace, Knochenhaut, etc.) und weder Haut noch Subcutis innervieren. Es durfte folglich nur eine Antwort auf mechanischen Druck auf das Gelenk folgen, und nicht auf Zwicken oder Bestreichen der Haut über dem Gelenk.
- Die abgeleiteten Aktionspotentiale mussten sich in ihrer Amplitude deutlich vom Hintergrundrauschen abheben, d. h. die Amplitude sollte am Oszilloskop mindestens dreimal so hoch sein wie die der Hintergrundaktivität.
- Das Aktionspotential sollte über einen längeren Zeitraum (Versuchsdauer ca. 200 min) Größe und Form behalten und sich deutlich von zusätzlichen, zufällig abgeleiteten Aktionspotentialen unterscheiden, um eine sichere Aufzeichnung der richtigen Signale über die gesamte Versuchsdauer zu gewährleisten.

Es gab zwei Arten von Neuronen, die sich anhand der Größe ihres rezeptiven Feldes sowie ihrer Antwort auf noxische und nicht-noxische Reize unterscheiden ließen:

- High-threshold (HT)-Neurone besaßen eine hohe Antwortschwelle und konnten deshalb nur durch starke, d. h. schmerzhaft Reize aktiviert werden.

- Wide-dynamic-range (WDR)-Neurone ließen sich bereits durch schwache Reize aktivieren, eine Erhöhung der Reizstärke ging hier jedoch mit einer Frequenzerhöhung einher.

Nachdem eine Nervenzelle gefunden worden war, die den erforderlichen Auswahlkriterien genügte, wurde die Größe des rezeptiven Feldes bestimmt und per Skizze dokumentiert (vgl. Abbildung 3.2).

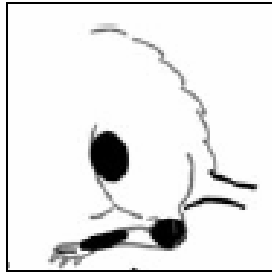


Abbildung 3.2: Rezeptives Feld (Quelle: modifiziert aus Bär et al., 2004)

Das rezeptive Feld des untersuchten Neurons lag zwar zu Beginn des Versuches auf dem linken Knie des Versuchstieres, es erfolgte jedoch zusätzlich zur Reizung des Kniegelenkes eine routinemäßige Simulation von Sprunggelenk und Pfote, um für den Fall einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes im Verlauf des Experiments Rückschlüsse auf eine spinale Beteiligung an der Entstehung der Übererregbarkeit führen zu können.

Um das Kniegelenk mechanisch zu reizen, wurde ein kalibrierter mechanischer Stempel (CORREX, Haag-Streit, Bern, Schweiz) am Versuchsaufbau fixiert, mit dessen Hilfe Druck auf die mediolaterale Achse des Kniegelenks ausgeübt werden konnte. Um einen nicht-noxischen Reiz auf das Kniegelenk auszuüben, wurde der Stempel mit einem Druck von $1,9 \text{ N} / 40 \text{ mm}^2$ gegen das Knie gedrückt, zur noxischen Reizung wurde ein Druck von $7,8 \text{ N} / 40 \text{ mm}^2$ angelegt. Die Dauer des Reizes betrug jeweils 15 Sekunden.

Um eine mediolaterale Kompression des Sprunggelenks sowie eine dorsoventrale Kompression der Pfotenmitte herbeizuführen, wurden modifizierte Krokodilklemmen benutzt, mit denen ebenfalls ein nicht-noxischer Reiz ($1,1 \text{ N} / 20 \text{ mm}^2$) sowie ein noxischer Reiz ($5,8 \text{ N} / 20 \text{ mm}^2$) ausgeübt werden konnte.

3.4.2 Versuchsprotokoll

Das Ziel des Experiments war, den Einfluss von spezifischen Agonisten an den EP-Rezeptoren (EP₁-EP₄) auf das Antwortverhalten des abgeleiteten Neurons zu untersuchen.

Die jeweils zu testende Substanz wurde dabei in steigenden Konzentrationen in den auf das Rückenmark aufgesetzten Pool appliziert.

Das Stimulationsprotokoll bestand aus fünfminütigen Stimulationssequenzen, in denen jeweils das Kniegelenk, das Sprunggelenk sowie die Pfote hintereinander je 15 Sekunden lang nicht-noxisch und nach 15 Sekunden Pause weitere 15 Sekunden lang mit noxischer Reizstärke stimuliert wurden.

Obwohl das Hauptaugenmerk auf das Kniegelenk gerichtet war, beinhaltete das rezeptive Feld des untersuchten Neurons oft auch das Sprunggelenk und die Pfote. Deshalb wurden diese beiden Regionen ebenfalls wie das Kniegelenk stimuliert und die erhaltenen Antworten registriert und ausgewertet. Die Reihenfolge Kniegelenk → Sprunggelenk → Pfote wurde stets eingehalten, auch in den Fällen, in denen sich das rezeptive Feld des untersuchten Neurons nicht bis zum Sprunggelenk bzw. zur Pfote erstreckte. Nach dem letzten Stimulus eines Blockes (noxische Reizung der Pfote) kam es zu einer zweiminütigen Pause, bevor der nächste Block erneut mit der nicht-noxischen Reizung des Kniegelenks begann (siehe Abbildung 3.3).

Neurone, die weder auf nicht-noxische noch auf noxische Reize an Sprunggelenk oder Pfote antworteten, wurden zwar durchgehend gereizt, gingen jedoch für diese Reizungsorte nicht mit in die Auswertung bzw. Darstellung ein. Aus diesem Grund war die Anzahl der Neurone bei Stimulation von Sprunggelenk bzw. Pfote in einigen Fällen geringer als die Anzahl der Neurone bei Kniestimulation.

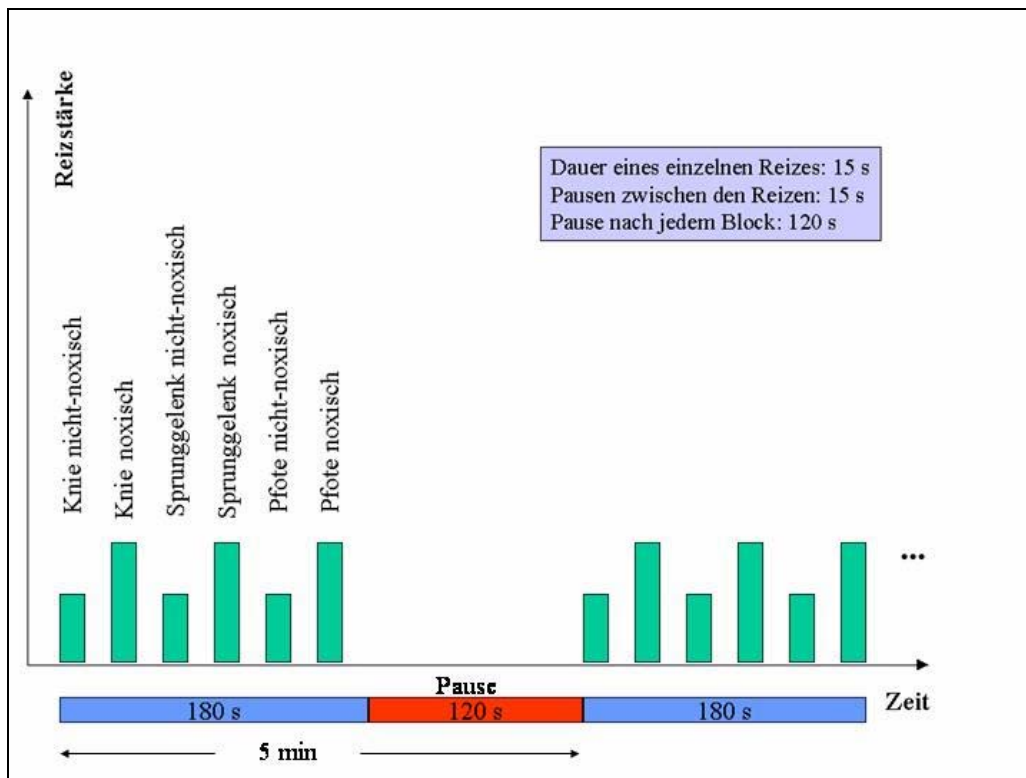


Abbildung 3.3: Zeitlicher Ablauf der Stimuli; nach jedem Stimulationsblock à 5 min; danach erneute Reizung in gleicher Reihenfolge

Zu Beginn des Protokolls war es nötig, ein Ausgangsniveau der neuronalen Antworten zu erhalten (Baseline), um später den Effekt einer an dem EP-Rezeptor wirksamen Substanz beurteilen und auswerten zu können. Deshalb wurde jeweils zu Beginn eines Versuches lediglich die Trägersubstanz (z. B. 0,07% Ethanol in Tyrode) ohne wirksamen Agonisten in den Pool auf dem Rückenmark appliziert und das Gelenk so lange im oben gezeigten Schema stimuliert, bis fünf Antworten in Folge in etwa gleich groß ausfielen, welche dann als Baseline definiert wurden.

Nun wurde die Lösung im Pool unter mikroskopischer Sicht mit einer Pipette entfernt, und durch ein Gemisch ersetzt, welches neben der Trägerlösung auch den verdünnten spezifischen EP-Agonisten enthielt. Jeweils nach 50 Minuten (entspricht einem Block von zehn Stimulationen) wurde die Lösung mit der Pipette wieder entfernt, und durch ein Gemisch ersetzt, in dem der spezifische EP-Rezeptor-Agonist in 10fach höherer Konzentration vorlag.

Zu den verwendeten Konzentrationen der einzelnen Substanzen siehe Tabelle 3.1 sowie Abbildung 3.4.

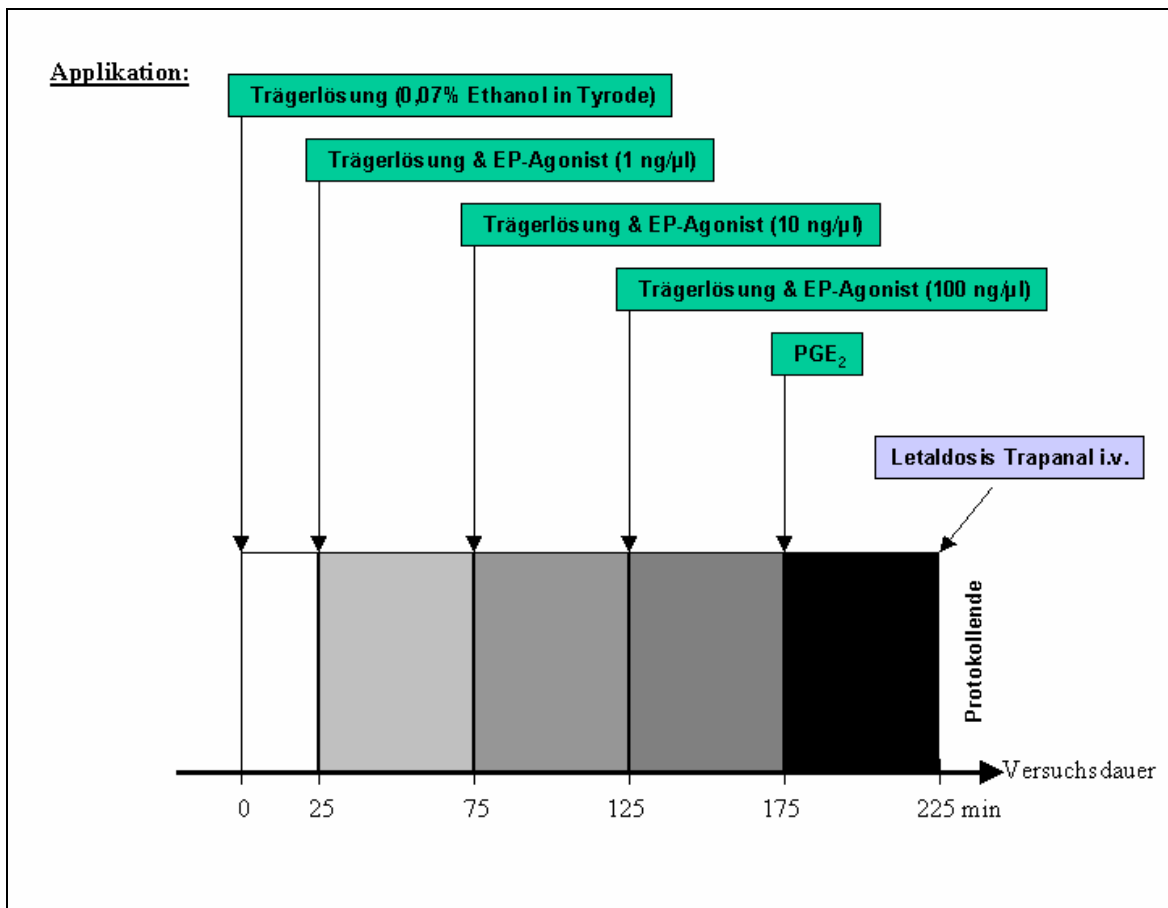


Abbildung 3.4: Versuchsprotokoll mit drei unterschiedlichen ansteigenden Konzentrationen des Agonisten und abschließender Gabe von PGE₂

3.5 Datenverarbeitung

3.5.1 Datenaufzeichnung

Die Antwort des Neurons folgte stets unmittelbar nach dem Beginn der Reizung, es wurden alle Aktionspotentiale gezählt, die während der 15 Sekunden dauernden Reizung auftraten.

Prinzipiell können zwei Arten der Auswertung unterschieden werden:

- Die Online-Auswertung erfolgte in Echtzeit während des Experiments mithilfe des Digital-Oszilloskops, die Anzahl der gezählten Aktionspotentiale wurde nach Reizende jeweils sofort schriftlich protokolliert. Das schriftliche Versuchsprotokoll diente zur Kontrolle der später folgenden Offline-Auswertung (s. u.), um etwaige systemische Fehler frühzeitig erkennen zu können. Für die nachfolgende statistische Auswertung wurden jedoch nur die Ergebnisse aus der Offline-Auswertung verwendet.

- Die Offline-Auswertung nach der Beendigung des Experimentes erfolgte mit der SPIKE / SPIDI-Software, die es ermöglichte, die gesuchten Aktionspotentiale anhand ihrer Form und Amplitude zu identifizieren, und aus den aufgezeichneten Rohdaten herauszufiltern.

3.5.2 Datenanalyse und Statistik

Zur Beurteilung der Aktivität des untersuchten Neurons wurden alle Aktionspotentiale während der 15 Sekunden andauernden Stimulation gezählt. Zuerst wurden die Antworten auf jeden Stimulus während der 25 Minuten andauernden Baseline gemittelt und als Mittelwert dargestellt. Außerdem wurden die Antworten während der letzten 25 Minuten (2. Hälfte) eines Konzentrationsblocks unter Applikation des spezifischen EP-Rezeptor-Agonisten gemittelt. Die aus allen Versuchen erhaltenen Werte der Baseline und die Werte nach Applikation des Agonisten wurden mithilfe des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen (Wilcoxon matched pairs signed rank test) miteinander verglichen. Zuerst wurde der Unterschied zwischen der Antwortzahl bei Applikation der höchsten Agonisten-Dosis mit der Baseline verglichen. Bei signifikantem Unterschied erfolgte ein Vergleich der Baseline mit der nächst niedrigeren Konzentration. Eine signifikante Abweichung von der Baseline wurde für $p < 0.05$ angenommen. Dargestellt ist die niedrigste Konzentration, bei der eine signifikante Veränderung eintritt.

3.5.3 Normierung der Ergebnisse zum Vergleich

Durch jedes Experiment erhielt man sechs Datenreihen (siehe Tabelle 3.2). Zum Teil kam es bei den unterschiedlichen Zellen dabei zu erheblichen Unterschieden der Baselines (= Ausgangslevel). Um zu verhindern, dass Zellen mit sehr großen Antworten bei der Darstellung des Mittelwertes dominierten, erfolgte eine Normierung der Daten. Diese wurde dadurch erzielt, dass die Datenreihe parallel verschoben wurde, so dass die Baseline auf Null gesetzt wurde. Dies wurde erreicht, indem von jedem Wert einer Datenreihe die zuvor gemittelte Baseline subtrahiert wurde (siehe Abbildung 3.5). Aus diesem Grund können in den Abbildungen, beispielsweise bei abnehmenden Antworten unter der Substanzapplikation, negative Werte für die Antworten (Aktionspotentiale je 15 Sekunden) auftreten.

Abbildung 3.5 stellt den Verlauf eines fiktiven Experimentes mit 25 Messzeitpunkten dar, bei dem die oben beschriebene Normierung durchgeführt wurde.

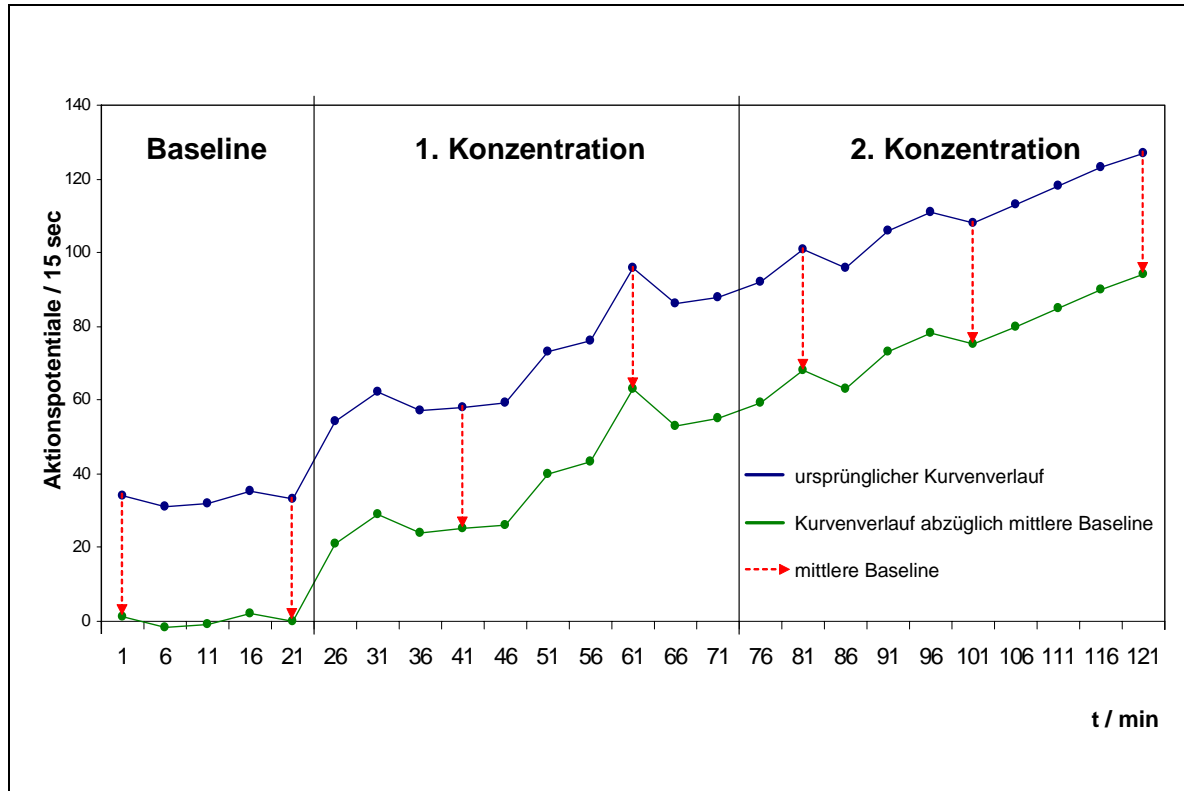


Abbildung 3.5:

Beispielhafte Darstellung der Versuchsnormierung: die ersten fünf Messwerte wurden zuerst als Baseline definiert. Die blaue Kurve zeigt die Anzahl der gemessenen Aktionspotentiale / 15 sec im Zeitverlauf. Um die erwünschte Parallelverschiebung der Kurve zu erzielen, wurde von jedem einzelnen Wert der Mittelwert aller zur Baseline gehörenden Werte (in diesem fiktiven Beispiel „33“) subtrahiert. Durch dieses „Zurücksetzen“ der Baseline auf Null wurde eine Normierung erreicht, mit deren Hilfe verschiedene Zellen mit verschieden hohen Ausgangsleveln optisch besser miteinander verglichen werden konnten.

3.6 Beispiel eines Versuches

Zunächst sollen exemplarisch Ablauf und Auswertung eines einzelnen Versuches dargestellt werden. Als Beispiel wurde hier das Experiment P197 mit dem EP₁-Agonisten gewählt.

3.6.1 Verarbeitung der Rohdaten

Es wurden alle Aktionspotentiale (AP) gezählt, die während der 15 Sekunden andauernden Reizung der entsprechenden Stelle (Knie = knee, Sprunggelenk = ankle oder Pfote = paw)

auftreten. Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Zahlenwerte entsprechen je der Zahl der Antworten im untersuchten Neuron je 15 Sekunden und wurden durch die Auswertung des Versuches mit der SPIKE / SPIDI-Software erhalten, mit deren Hilfe man das Signal des gewünschten Neurons aus allen aufgezeichneten Signalen herausfiltern konnte. Es erfolgten fünf Versuchsblöcke à fünf Minuten ohne Applikation des Agonisten, welche als Baseline dienten. Danach wurde für je zehn Versuchsblöcke der Agonist in steigenden Konzentrationen auf das Rückenmark appliziert.

Tabelle 3.1: kompletter Rohdatensatz des Experimentes P197; inn. = innocuous (leichter Reiz), nox. = noxious (schmerzhafter Reiz)

Zeit / min	Reizort und Reizstärke						
	Knee inn.	Knee nox.	Ankle inn.	Ankle nox.	Paw inn.	Paw nox.	
1	0	79	0	29	0	0	Baseline
6	3	65	0	61	0	0	
11	3	71	2	51	0	0	
16	2	69	2	57	0	0	
21	5	70	3	54	0	0	
26	6	93	4	152	0	0	1. Konzentration
31	5	108	4	175	1	0	
36	7	143	6	181	1	0	
41	9	118	7	164	0	0	
46	4	134	17	197	2	1	
51	11	140	10	187	0	0	
56	14	151	31	195	0	0	
61	20	197	14	196	0	2	
66	19	222	28	209	0	5	
71	30	214	26	160	0	1	
76	18	198	14	174	0	1	2. Konzentration
81	20	234	25	218	0	3	
86	43	203	53	177	0	1	
91	39	225	48	227	0	1	
96	48	227	47	193	0	2	
101	22	225	55	237	0	0	
106	33	230	24	232	0	5	
111	42	242	33	260	0	33	
116	44	253	69	265	0	26	
121	41	255	44	312	5	45	
126	49	247	55	254	3	47	3. Konzentration
131	65	242	62	301	20	67	
136	79	299	54	322	5	57	
141	66	273	116	321	44	149	
146	69	277	99	314	73	111	
151	79	301	101	305	24	66	
156	88	307	92	383	31	133	
161	121	311	110	261	72	132	
166	86	315	85	312	32	109	
171	98	336	144	371	52	156	
176	77	348	146	348	66	200	4. Konzentration
181	131	350	166	370	51	131	

186	125	356	204	331	41	130	
191	143	391	123	371	18	100	
196	129	397	166	327	29	126	
201	128	379	149	414	64	77	
206	128	467	212	441	124	177	
211	168	482	272	384	92	133	
216	173	495	194	425	85	273	
221	187	561	179	437	54	219	

3.6.2 Grafische Darstellung der Daten des Beispielsperiments P197

Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft für die Reizung des Kniegelenks den Verlauf des Antwortverhaltens des untersuchten Neurons für nicht-noxische (untere Linie) und noxische (obere Linie) Stimulation.

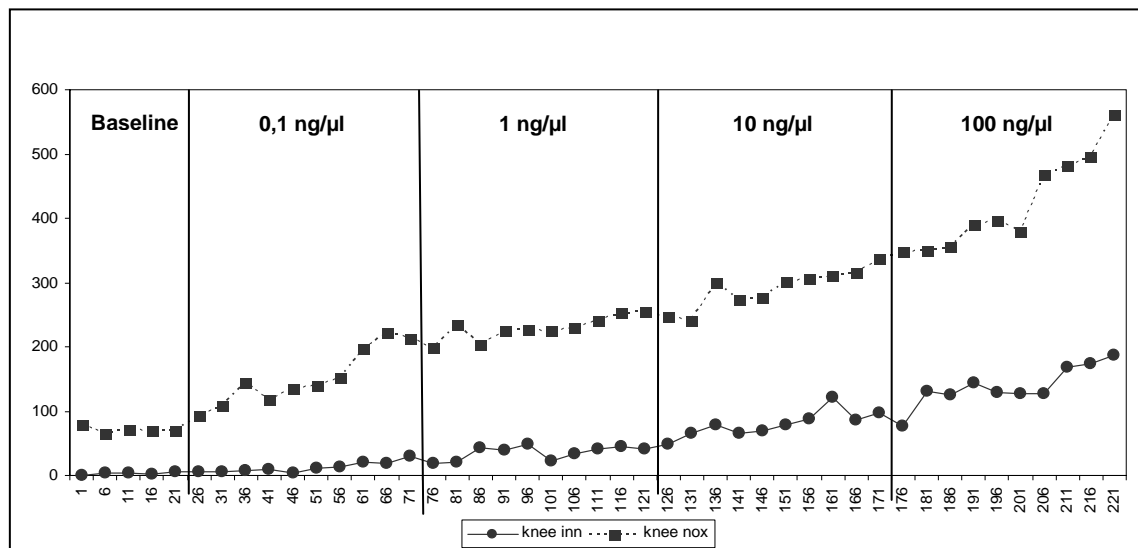


Abbildung 3.6:

Zeitlicher Verlauf des Antwortverhaltens des in Versuch P197 untersuchten Neurons auf mechanische Reizung des Kniegelenks unter Applikation des EP₁-Agonisten ONO-DI-004; auf der y-Achse Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec unter mechanischer Stimulation; Baseline: 25 min; 4 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von ONO-DI-004 nach 25, 75, 125 min

Im nachfolgenden Kapitel 4 werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsreihen unserer Studie ausführlich dargestellt.

4 Ergebnisse

Vor der detaillierten Darstellung der Ergebnisse sollen zunächst einige Angaben zu den abgeleiteten Rückenmarksneuronen erfolgen.

4.1 Überblick über die Neurone

Es wurden ausschließlich Rückenmarkneurone mit Afferenzen aus dem linken Kniegelenk untersucht. Die Ableitungen erfolgten bei insgesamt 37 Zellen (\triangleq Versuchstieren) im tiefen Hinterhorn der Segmente L₁-L₄ in einer Tiefe von durchschnittlich 929 μm (zwischen 463 und 1245 μm). Es wurde jeweils nur ein einziges Neuron abgeleitet, was bedeutet, dass mit der Untersuchung erst dann begonnen werden konnte, sobald man das Signal einer einzelnen Zelle ohne Überlagerung durch Antworten anderer Neurone erhalten hatte.

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurden insgesamt sechs Neurone getestet (s. Kapitel 4.2 und 4.3) bevor im Hauptteil der Untersuchungsreihe insgesamt 31 Hinterhornneurone unter Gabe der spezifischen Agonisten (EP₁ – EP₄) untersucht wurden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die unterschiedlichen Charakteristika der untersuchten Neurone gegeben werden:

- Unter den 31 mit den spezifischen Agonisten behandelten Zellen fanden sich 27 WDR (= wide dynamic range)-Neurone, welche schwach auf nicht-noxische und stark auf noxische Stimulation antworteten.
- Vier Neurone waren spezifisch nozizeptive HT (= high threshold)-Neurone, d. h. sie reagierten nur auf Reizungen wie noxischen Druck auf das Gelenk, jedoch nicht auf nicht-noxische Reize.
- Bei sieben der untersuchten Neuronen beinhaltete das rezeptive Feld vor der Applikation des spezifischen Agonisten nur das Knie.
- Bei acht Neuronen beinhaltete das rezeptive Feld vor der Applikation das Knie und das Sprunggelenk.
- Bei elf Neuronen fand sich von Beginn an ein rezeptives Feld, welches Knie, Sprunggelenk und Pfote beinhaltete.

Der Einfluss der Applikation der verschiedenen Agonisten wird in den Kapiteln 4.4 – 4.7 detailliert beschrieben.

4.2 Spinale Applikation der Vehikellösung

Um sicherzustellen, dass die Trägersubstanz keine Aktivierung der EP-Rezeptoren im Rückenmark auslöst, wurden zuerst drei Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen lediglich Tyrode (s. Kapitel 3.1) ohne wirksame Inhaltsstoffe auf das Rückenmark appliziert wurde. Außerdem konnte so der Effekt einer mechanischen Langzeitstimulation des Beins (> 150 min) untersucht werden. Es wurde das gleiche Blockparadigma (s. Abbildung 3.4) angewendet, wie später auch bei den Experimenten mit den Agonisten, d. h. nach Aufzeichnung einer Baseline über 25 min erfolgten drei Stimulationsblöcke à 50 min mit Zählung der während der mechanischen Stimulation ausgelösten Aktionspotentiale (AP). Alle drei untersuchten Neurone hatten ein rezeptives Feld, das sich über Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote erstreckte. Tabelle 4.1 zeigt die über alle Versuche mit Tyrode gemittelten Antwortraten der jeweils letzten 25 Minuten eines Stimulationsblockes.

Tabelle 4.1: über alle Versuche mit Tyrode gemittelte AP / 15 sec \pm SEM (Standardfehler) in den jeweils letzten 25 min eines Stimulationsblockes; (n = 3)

Reiz		Baseline	1. Block	2. Block	3. Block
Knie (Knee)	nicht-noxisch	22 \pm 16	19 \pm 16	19 \pm 16	21 \pm 19
	noxisch	100 \pm 37	91 \pm 42	97 \pm 48	96 \pm 49
Sprunggelenk (Ankle)	nicht-noxisch	37 \pm 22	47 \pm 30	45 \pm 30	42 \pm 29
	noxisch	109 \pm 55	102 \pm 55	105 \pm 57	100 \pm 52
Pfote (Paw)	nicht-noxisch	21 \pm 17	16 \pm 15	20 \pm 20	20 \pm 20
	noxisch	21 \pm 11	17 \pm 13	14 \pm 13	16 \pm 14

Durch die Applikation von Tyrode kam es zu keiner signifikanten Veränderung im Antwortverhalten der untersuchten Neurone, so dass davon auszugehen ist, dass zum einen die Applikation von Tyrode keinen wesentlichen Einfluss auf das Antwortverhalten von Neuronen hat und sich zum anderen das Antwortverhalten eines Neurons nach Langzeitreizung (> 150 min) nicht ändert. Des Weiteren kam es unter der Gabe von Tyrode zu keiner Veränderung in der Ausdehnung des rezeptiven Feldes.

Abbildung 4.1 stellt den Verlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung des Kniegelenks unter Applikation von Tyrode dar. Für die grafische Darstellung erfolgte bei allen Versuchen die in Kapitel 3.5.3 beschriebene Baseline-Normierung.

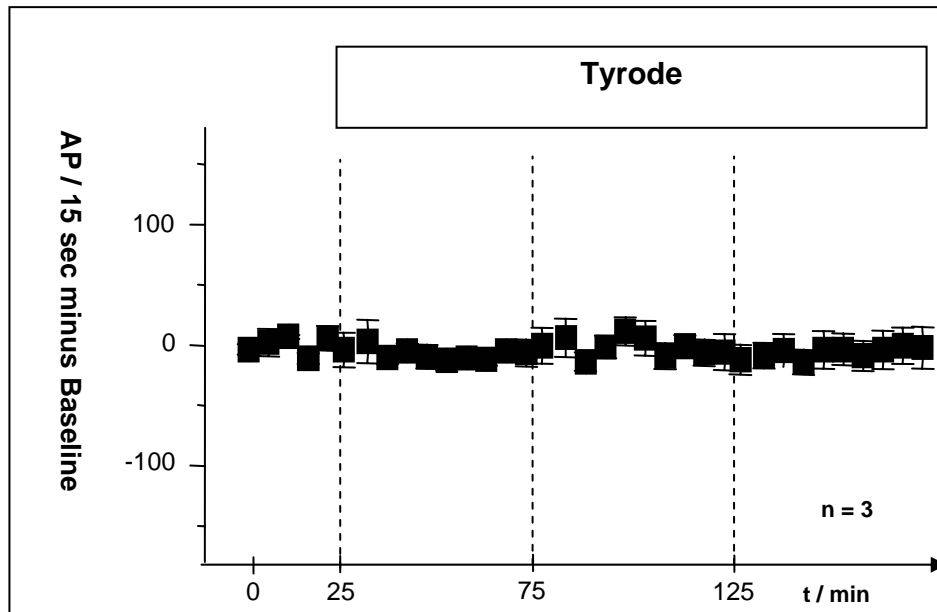


Abbildung 4.1: Zeitverlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung des Kniegelenks unter Applikation von Tyrode; gemittelte Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec (Mittelwerte \pm Standardfehler) aller untersuchten Neurone unter mechanischer Stimulation; Baseline: 25 min; 3 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von Tyrode nach 25, 75, 125 min; n (Anzahl der untersuchten Neurone) = 3

4.3 Spinale Applikation von PGE_2

Um die Effekte einer Langzeitwirkung von PGE_2 auf ein Neuron zu untersuchen, wurden drei Versuche durchgeführt, bei denen für die Dauer von 150 min (entspricht 3 Stimulationsblöcken) ausschließlich PGE_2 in der Konzentration 100 ng/ μl appliziert wurde.

Bei allen untersuchten Neuronen lag das Knie vor Applikation von PGE_2 innerhalb des rezeptiven Feldes (RF), bei zwei von diesen Neuronen erstreckte sich das RF bis zum Sprunggelenk und bei einem der untersuchten Neurone beinhaltete das RF vor der Applikation neben Knie und Sprunggelenk die Pfote.

Die mittleren Antwortraten der abgeleiteten Neurone in den letzten 25 min jedes Versuchsblockes sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: über alle Versuche mit PGE₂ gemittelte AP / 15 sec \pm SEM (Standardfehler) in den jeweils letzten 25 min eines Stimulationsblockes (n = 3)

Reiz		Baseline	1. Block	2. Block	3. Block
Knie (Knee)	nicht-noxisch	31 \pm 16	93 \pm 48	169 \pm 32	215 \pm 73
	noxisch	158 \pm 52	483 \pm 152	514 \pm 110	606 \pm 85
Sprunggelenk (Ankle)	nicht-noxisch	4 \pm 2	39 \pm 17	243 \pm 74	138 \pm 43
	noxisch	335 \pm 110	421 \pm 133	609 \pm 192	500 \pm 196
Pfote (Paw)	nicht-noxisch	0 \pm 1	1 \pm 1	54 \pm 17	39 \pm 17
	noxisch	1 \pm 1	8 \pm 4	206 \pm 73	223 \pm 65

Die Applikation von PGE₂ führte zu einem signifikanten Anstieg der Antwortraten der untersuchten Neurone. Bei zwei der untersuchten Neurone kam es zu einer Ausdehnung des rezeptiven Feldes bis auf Sprunggelenk und Pfote.

In der Abbildung 4.2 ist der Verlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone unter PGE₂-Applikation und noxischer Reizung nach einer Baselinekorrektur dargestellt.

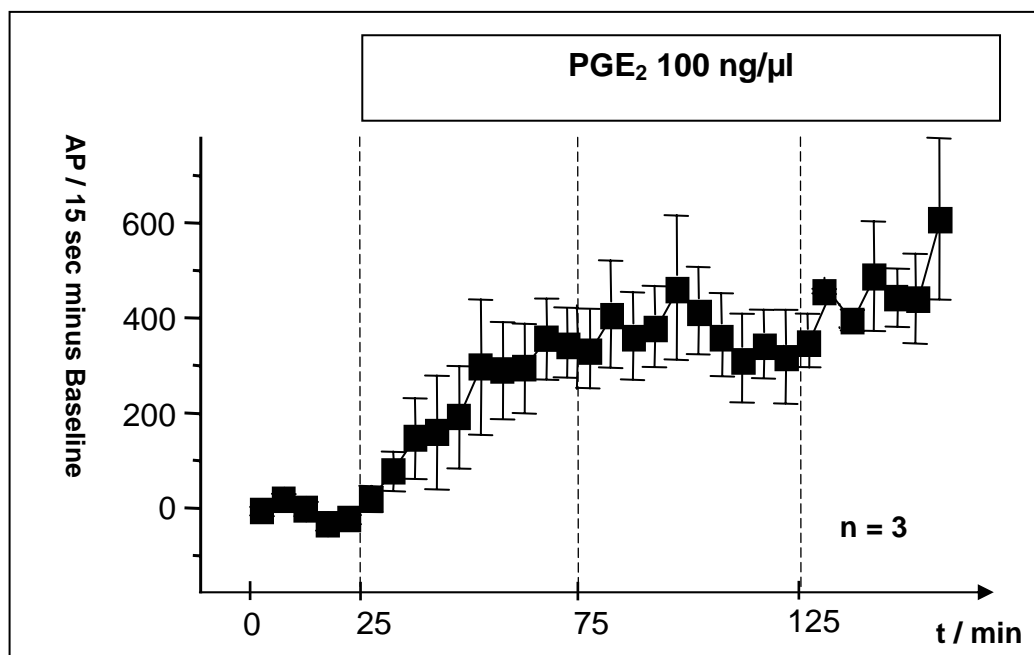


Abbildung 4.2: Zeitverlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung des Kniegelenks unter Applikation von PGE₂; gemittelte Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec (Mittelwerte \pm Standardfehler) aller untersuchten Neurone unter mechanischer Stimulation; Baseline: 25 min; 3 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von PGE₂ (100 ng/µl) nach 25, 75, 125 min; n = 3

4.4 Spinale Applikation des EP₁-Agonisten ONO-DI-004

In der nächsten Versuchsreihe wurde das Antwortmuster bei lokaler Applikation des spezifischen EP₁-Agonisten ONO-DI-004 auf das Rückenmark beobachtet. Nach Aufzeichnung einer Baseline mit Tyrode über 25 min wurde ONO-DI-004 in vier ansteigenden Konzentrationen (0,1 ng/μl, 1 ng/μl, 10 ng/μl, 100 ng/μl) appliziert, wobei jeweils nach 50 min der Wechsel auf die nächst höhere Konzentration erfolgte. Zum Versuchsende erstreckte sich das rezeptive Feld bei allen untersuchten Neuronen über Knie und Sprunggelenk, bei neun dieser Neuronen reichte das RF bis zur Pfote.

Tabelle 4.3 zeigt die kumulativen durchschnittlichen Entladungsraten der untersuchten Neurone in den letzten 25 min eines Versuchsblockes.

Tabelle 4.3: über alle Versuche mit ONO-DI-004 gemittelte AP / 15 sec ± SEM (Standardfehler) in den jeweils letzten 25 min eines Stimulationsblockes; n (Knie, Sprunggelenk) = 10; n (Pfote) = 9

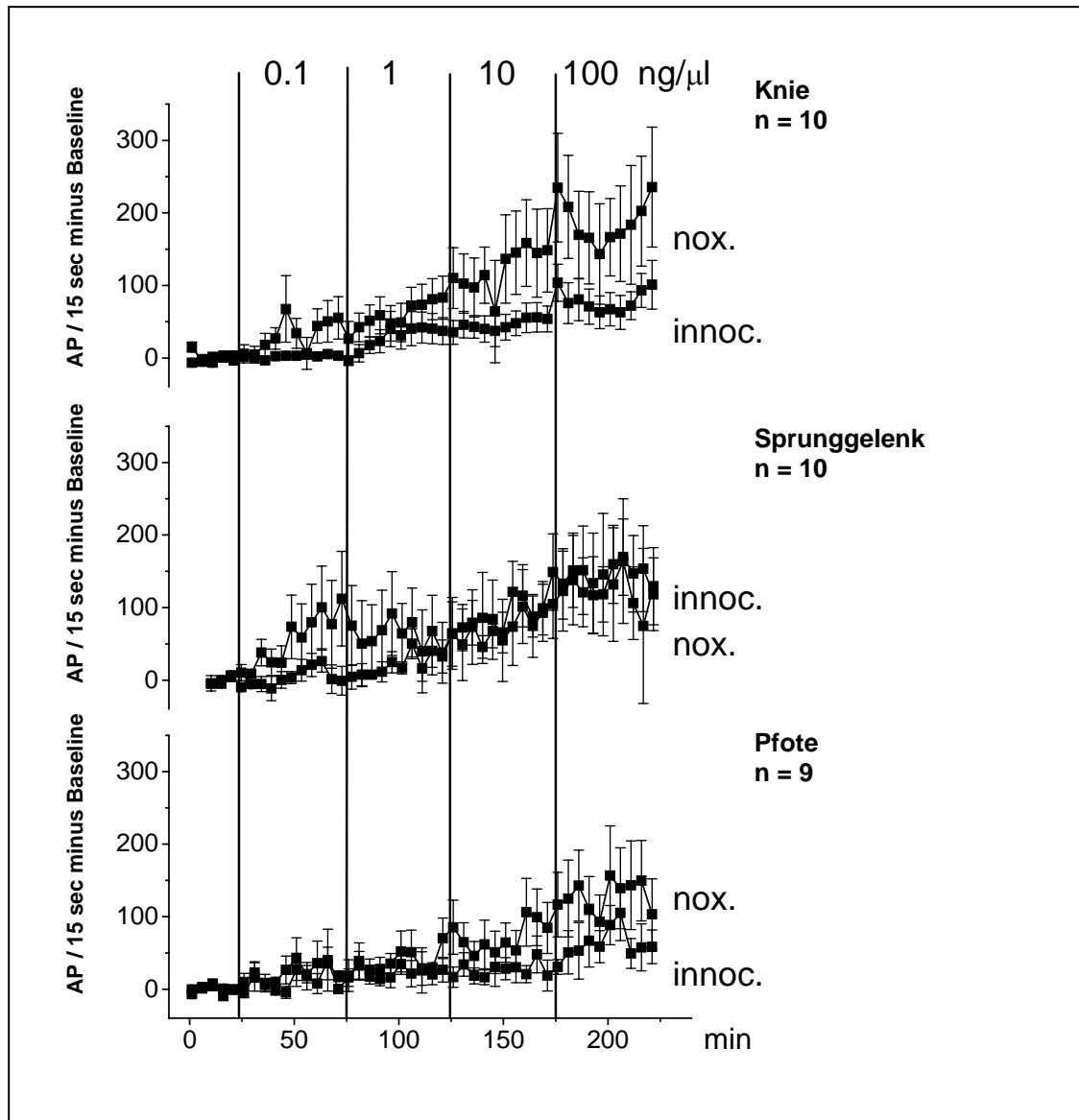
Reiz		Baseline	0,1 ng/μl	1 ng/μl	10 ng/μl	100 ng/μl
Knie (Knee)	nicht-noxisch	46 ± 21	24 ± 14	84 ± 40	100 ± 37	131 ± 39
	noxisch	153 ± 36	139 ± 40	225 ± 47	310 ± 63	356 ± 70
Sprunggelenk (Ankle)	nicht-noxisch	32 ± 18	32 ± 16	72 ± 35	150 ± 54	185 ± 66
	noxisch	152 ± 60	210 ± 107	210 ± 64	257 ± 72	295 ± 90
Pfote (Paw)	nicht-noxisch	32 ± 16	58 ± 34	58 ± 23	63 ± 25	104 ± 36
	noxisch	62 ± 29	80 ± 43	108 ± 47	159 ± 55	223 ± 77

Mit steigender Dosis führte die spinale Applikation des EP₁-Agonisten ONO-DI-004 bei allen Reizungsorten zu einem signifikanten Anstieg der neuronalen Antworten auf nicht-noxischen und noxischen Druck. Unter dem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen) wurden die Zunahmen der Antworten bei nicht-noxischer und noxischer Reizung des Knies ab einer Konzentration von 1 ng/μl signifikant. Bei nicht-noxischer Reizung des Sprunggelenks kam es ab einer Konzentration von 10 ng/μl und bei noxischer Reizung ab 100 ng/μl zum signifikanten Anstieg der Antwortraten. Die nicht-noxische Reizung der Pfote führte ab einer Konzentration von 1 ng/μl zu einem signifikanten Anstieg der Antwortfrequenz, während unter noxischer Reizung bereits eine Agonistenkonzentration an 0,1 ng/μl zur signifikanten Zunahme der Antwortrate führte.

Bei einem Neuron hatte die Applikation des EP₁-Agonisten zur Ausdehnung des rezeptiven Feldes in Richtung Pfote geführt (vorher war $n_{\text{Pfote}} = 8$). Die Bahnung des Antwortverhaltens durch die Wirkung des Agonisten hatte auch eine Senkung der Reizschwelle zur Folge. So antworteten drei Neurone, die vor der Applikation des Agonisten lediglich auf noxische Reize reagiert hatten, nach der Applikation bereits auf nicht-noxische Reize.

Bei einem Neuron führte die Gabe des EP₁-Agonisten zu einem Anstieg der Sponantaktivität (= Antwortrate ohne zusätzlichen mechanischen Reiz) von 0,52 auf 2,4 Hz.

Die Abbildung 4.3 zeigt den Zeitverlauf der Effekte des EP₁-Agonisten auf die Antworten bei Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote (von oben nach unten) nach Normierung der Baseline.

**Abbildung 4.3:**

Zeitverlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter Applikation des EP₁-Agonisten ONO-DI-004; gemittelte Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec (Mittelwerte \pm Standardfehler) aller untersuchten Neurone unter mechanischer Stimulation; Baseline: 25 min; 4 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von ONO-DI-004 (0,1 ng/μl, 1 ng/μl, 10 ng/μl, 100 ng/μl) nach 25, 75, 125, 175 min; n = Anzahl der untersuchten Neurone: n (Knie, Sprunggelenk) = 10, n (Pfote) = 9

Die folgende Abbildung 4.4 stellt am Beispiel des Kniegelenks den durchschnittlichen Anstieg der Antwortrate der Neurone (Mittelwert \pm Standardfehler) über der (korrigierten) Baseline für jede Agonistenkonzentration bei nicht-noxischer und noxischer Stimulation dar.

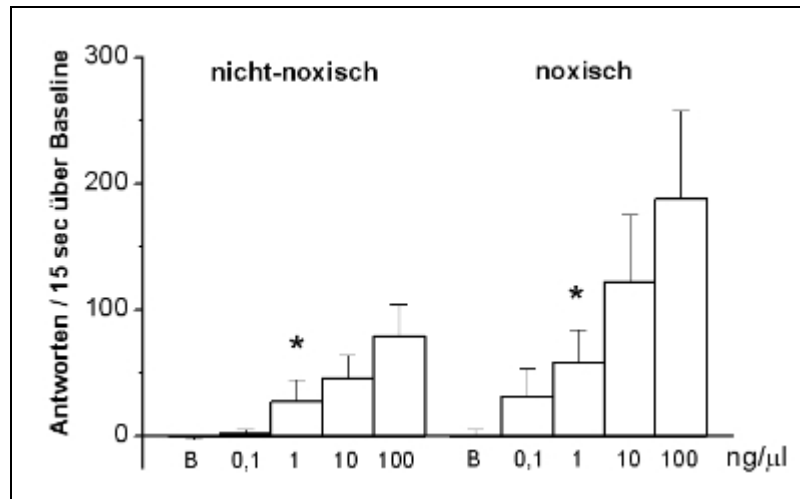


Abbildung 4.4: Darstellung des durchschnittlichen Anstiegs der neuronalen Antwort auf Reizung des Kniegelenks im Vergleich zur Baseline. Jede Säule entspricht einem Konzentrationsblock von 50 min, die Sterne über den Säulen markieren die geringste Konzentration der EP₁-Agonisten, die zu einem signifikanten Anstieg der Entladungsrate in Bezug auf die Baseline führte.

Zusammenfassend führte die Applikation des spezifischen EP₁-Agonisten ONO-DI-004 mit steigender Dosis zu einer Steigerung der neuronalen Antwortraten auf nicht-noxischen und noxischen Druck.

4.5 Spinale Applikation des EP₂-Agonisten Butaprost

Zur Untersuchung der Wirkung des EP₂-Rezeptors wurde in einer Versuchsreihe Butaprost, ein spezifischer EP₂-Agonist, appliziert. Nach einer Baseline mit Tyrode über 40 min erfolgten drei Blöcke à 50 min mit steigenden Konzentrationen von Butaprost (0,1 ng/μl, 1 ng/μl, 100 ng/μl). Zum Versuchsende erstreckte sich das rezeptive Feld von zwei der sechs untersuchten Neurone über Knie, Sprunggelenk und Pfote, bei den anderen vier Neuronen beinhaltete das RF nur das Kniegelenk.

Tabelle 4.4 zeigt die über alle Experimente mit Butaprost gemittelten Antwortraten je Konzentrationsblock.

Tabelle 4.4: über alle Versuche mit Butaprost gemittelte AP / 15 sec \pm SEM (Standardfehler) in den jeweils letzten 25 min eines Stimulationsblockes; n (Knie) = 6; n (Sprunggelenk) = 2; n (Pfote) = 2

Reiz		Baseline	0,1 ng/ μ l	1 ng/ μ l	100 ng/ μ l
Knie (Knee)	nicht-noxisch	19 \pm 13	27 \pm 12	78 \pm 23	116 \pm 32
	noxisch	243 \pm 98	270 \pm 95	412 \pm 128	453 \pm 122
Sprunggelenk (Ankle)	nicht-noxisch	3 \pm 2	7 \pm 5	92 \pm 20	239 \pm 66
	noxisch	94 \pm 40	110 \pm 15	212 \pm 49	429 \pm 99
Pfote (Paw)	nicht-noxisch	1 \pm 7	8 \pm 7	28 \pm 27	107 \pm 58
	noxisch	1 \pm 1	2 \pm 1	30 \pm 21	137 \pm 18

Die spinale Applikation von Butaprost, dem Agonisten am EP₂-Rezeptor, führte ebenso wie die Gabe von ONO-DI-004 (s. Kapitel 4.4) in steigenden Dosen zu einer Steigerung der Antwortraten auf nicht-noxischen und noxischen Druck. Bei einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen) führte die Reizung des Knies ab einer Agonistenkonzentration von 0,1 ng/ μ l zum statistisch bedeutsamen Anstieg der Antwortrate. Die Reizung von Sprunggelenk und Pfote führte bei keiner Konzentration zu einer signifikanten Veränderung im Antwortverhalten. Bei drei Neuronen führte die mit der Aktivierung des EP₂-Rezeptoren einhergehende Senkung der Reizschwelle zu dem Effekt, dass Neurone, die vor der Gabe von Butaprost nur auf noxische Reize am Sprunggelenk reagiert hatten, nach der Applikation auch auf nicht-noxische Stimuli antworteten. Bei zwei Neuronen hatte die Applikation von Butaprost außerdem zu einer Erweiterung des rezeptiven Feldes auf Sprunggelenk und Pfote geführt. In der Abbildung 4.5 ist der Zeitverlauf der Effekte der Agonisten auf die Antworten bei der Stimulation der drei Regionen Knie, Sprunggelenk und Pfote (von oben nach unten) abgebildet.

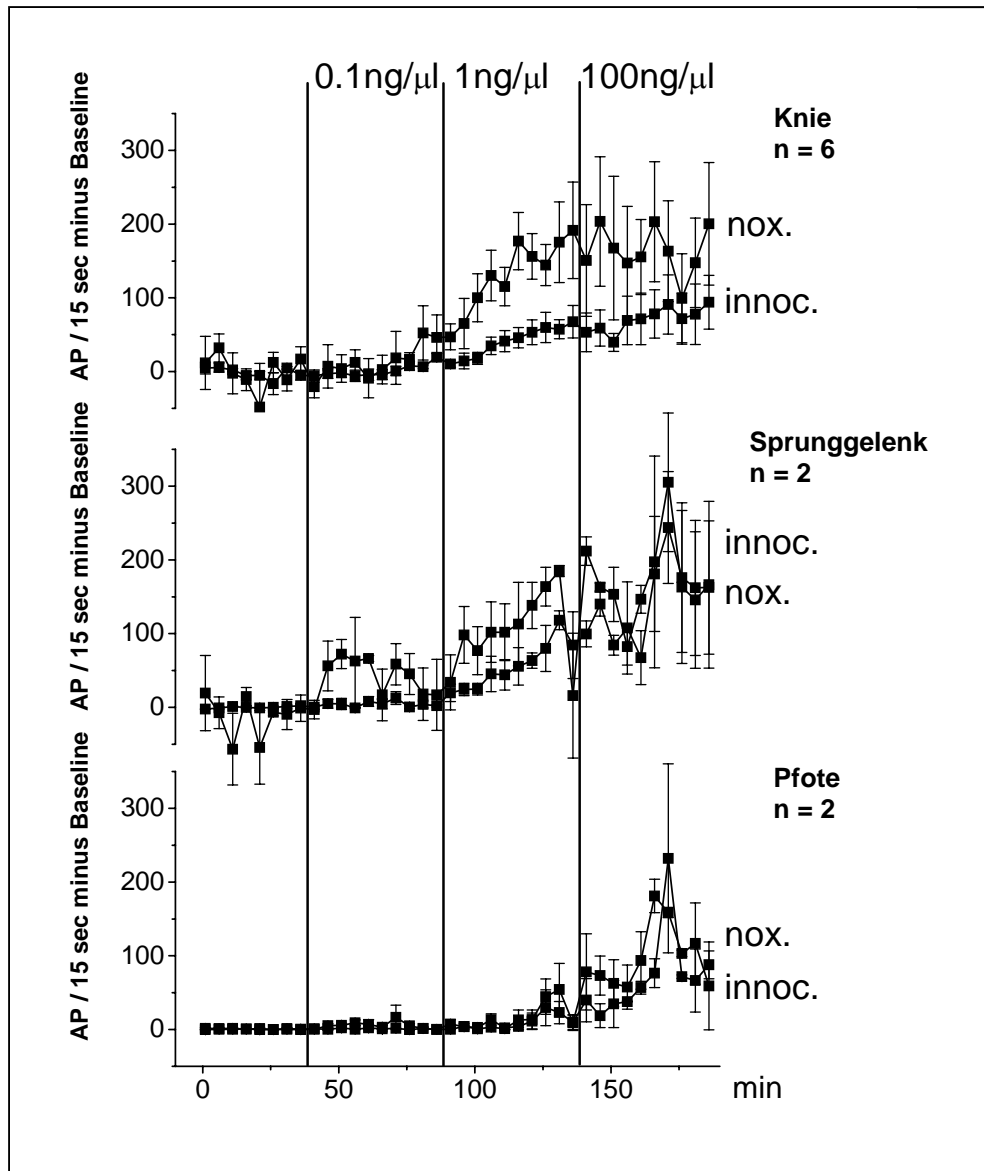


Abbildung 4.5: Zeitverlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter Applikation des EP₂-Agonisten Butaprost; gemittelte Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec (Mittelwerte \pm Standardfehler) aller untersuchten Neurone unter mechanischer Stimulation; Baseline: 40 min; 3 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von Butaprost (0,1 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 100 ng/ μ l) nach 40, 90, 140 min; n = Anzahl der untersuchten Neurone: n (Knie) = 6, n (Sprunggelenk) = 2, n (Pfote) = 2

In Abbildung 4.6 erfolgt am Beispiel des Kniegelenks eine Darstellung des durchschnittlichen Anstiegs der normierten Antworten (Mittelwert \pm Standardfehler), bezogen auf die korrigierte Baseline, für die einzelnen Konzentrationen unter nicht-noxischer und noxischer Reizung.

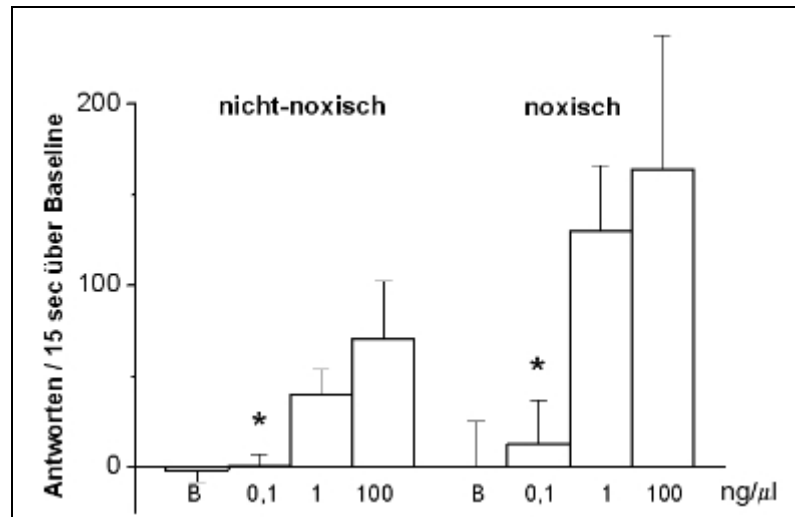


Abbildung 4.6:

Darstellung des durchschnittlichen Anstiegs der neuronalen Antwort auf Reizung des Kniegelenks im Vergleich zur Baseline. Jede Säule entspricht einem Konzentrationsblock von 50 min, die Sterne über den Säulen markieren die geringste Konzentration der EP₂-Agonisten, die zu einem signifikanten Anstieg der Entladungsrates in Bezug auf die Baseline führte.

Zusammenfassend führte die Applikation des spezifischen EP₂-Agonisten Butaprost mit steigender Konzentration zu einem Anstieg der neuronalen Antwortraten auf nicht-noxischen und noxischen Druck. Durch die Applikation von Butaprost kam es zu einer Absenkung der Erregungsschwelle der nozizeptiven Neurone sowie zu einer Ausdehnung des rezeptiven Feldes.

4.6 Spinale Applikation des EP₃-Agonisten ONO-AE-248

Um die Auswirkung einer Aktivierung des spinalen EP₃-Rezeptors auf das Antwortverhalten von spinalen Neuronen zu untersuchen, wurde nach einer Baseline mit der Vehikellösung über 25 min der spezifische Agonist am EP₃-Rezeptor, ONO-AE-248, in drei steigenden Konzentrationen (1 ng/μl, 10 ng/μl, 100 ng/μl) auf das Rückenmark appliziert, wobei jedes Applikationsintervall 50 min dauerte.

Nach Applikation von ONO-AE-248 wiesen alle acht untersuchten Neurone ein rezeptives Feld auf, welches das Kniegelenk beinhaltete, bei sechs dieser Neurone reichte das RF bis zum Sprunggelenk und vier Neurone besaßen ein rezeptives Feld, welches Knie, Sprunggelenk und Pfote beinhaltete.

Tabelle 4.5 zeigt die kumulativen durchschnittlichen Antwortraten der untersuchten Neurone je Stimulationsblock.

Tabelle 4.5: über alle Versuche mit ONO-AE-248 gemittelte AP / 15 sec \pm SEM (Standardfehler) in den jeweils letzten 25 min eines Stimulationsblockes; n (Knie) = 8; n (Sprunggelenk) = 6; n (Pfote) = 4

Reiz		Baseline	1 ng/ μ l	10 ng/ μ l	100 ng/ μ l
Knie (Knee)	nicht-noxisch	61 \pm 30	93 \pm 37	122 \pm 47	80 \pm 42
	noxisch	345 \pm 73	378 \pm 73	453 \pm 111	412 \pm 123
Sprunggelenk (Ankle)	nicht-noxisch	35 \pm 18	74 \pm 25	59 \pm 23	59 \pm 15
	noxisch	159 \pm 58	227 \pm 77	253 \pm 88	221 \pm 93
Pfote (Paw)	nicht-noxisch	17 \pm 10	39 \pm 19	46 \pm 19	29 \pm 14
	noxisch	24 \pm 13	90 \pm 43	100 \pm 40	86 \pm 29

Die spinale Applikation des spezifischen EP₃-Agonisten ONO-AE-248 führte in keinem Fall zu signifikanten Veränderungen im Antwortverhalten der untersuchten Neurone (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen), und zwar unabhängig von Reizort, Reizstärke oder Konzentration des Agonisten. Abbildung 4.7 zeigt die Verläufe der Antwortraten bei nicht-noxischer und noxischer Reizung an Knie, Sprunggelenk und Pfote (von oben nach unten). Nicht alle Neurone mit Afferenzen aus dem Knie hatten ein rezeptives Feld, welches auch Sprunggelenk und Pfote beinhaltetete, deshalb war die Anzahl der Neurone bei Stimulation von Sprunggelenk und Pfote kleiner als die Zahl der Neurone bei Kniestimulation. In der Abbildung 4.7 ist der Zeitverlauf der Effekte der Agonisten auf die Antworten bei der Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote (von oben nach unten) abgebildet.

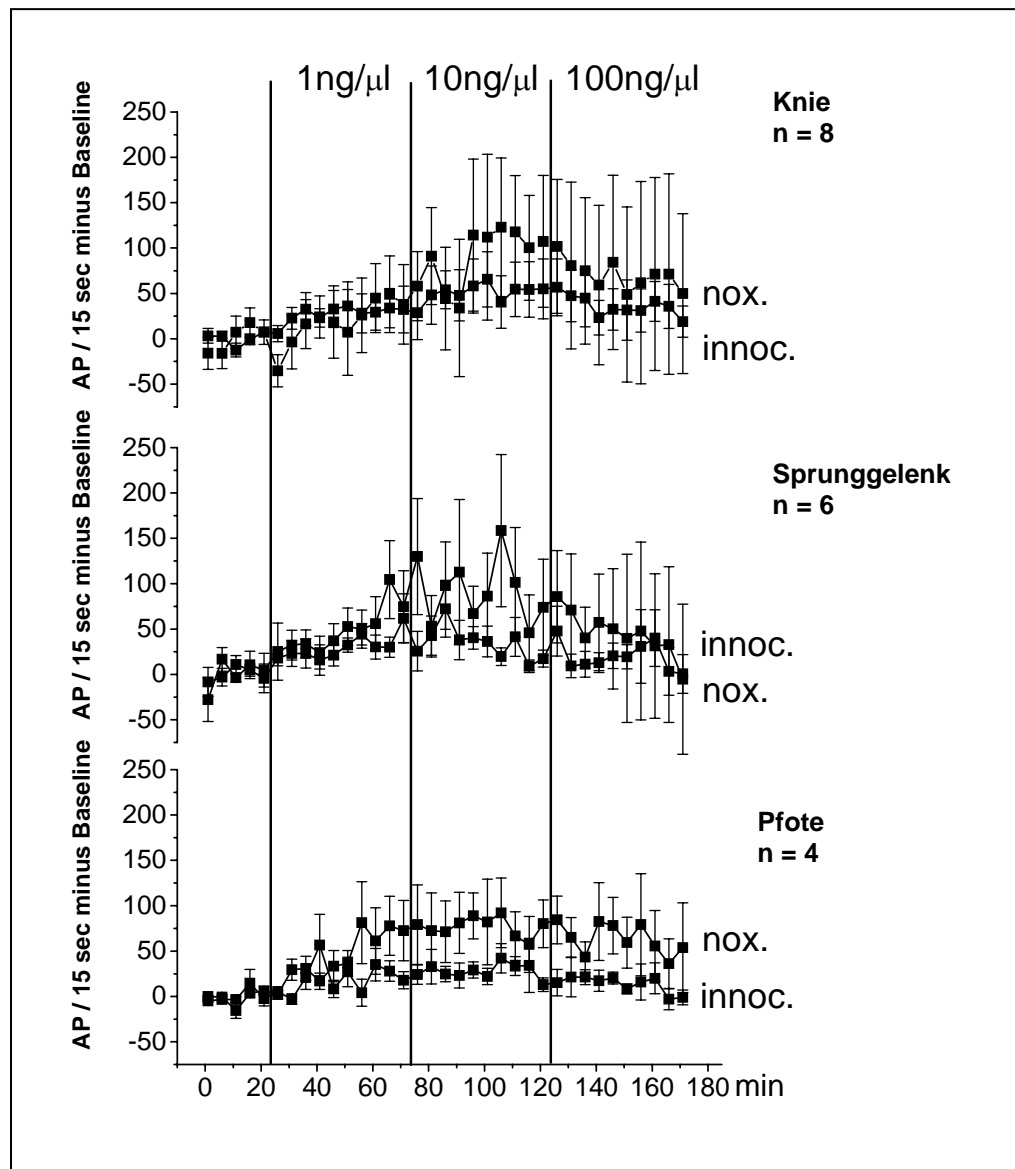


Abbildung 4.7:

Zeitverlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter Applikation des EP_3 -Agonisten ONO-AE-248; gemittelte Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec (Mittelwerte \pm Standardfehler) aller untersuchten Neurone unter mechanischer Stimulation; Baseline: 25 min; 3 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von ONO-AE-248 (1 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, 100 ng/ μ l) nach 25, 75, 125 min; n = Anzahl der untersuchten Neurone: n (Knie) = 8, n (Sprunggelenk) = 6, n (Pfote) = 4

In Abbildung 4.8 folgt am Beispiel des Kniegelenks eine Darstellung des durchschnittlichen Anstiegs der normierten Antworten (Mittelwert \pm Standardfehler) im Vergleich mit der korrigierten Baseline für die einzelnen Konzentrationen unter nicht-noxischer und noxischer Reizung.

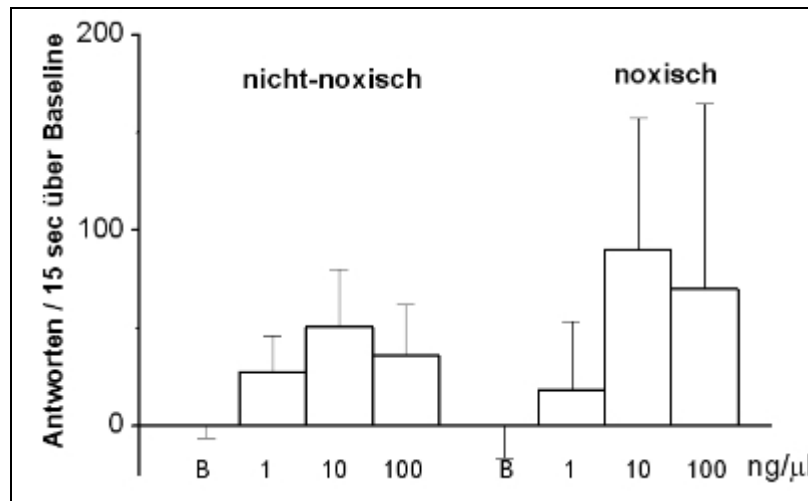


Abbildung 4.8: Darstellung des durchschnittlichen Anstiegs der neuronalen Antwort auf Reizung des Kniegelenks im Vergleich zur Baseline. Jede Säule entspricht einem Konzentrationsblock von 50 min.

Die Gesamtbetrachtung der Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem spezifischen EP₃-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 zeigt, dass die Aktivierung der EP₃-Rezeptoren im Rückenmark unabhängig von Reizstärke, Reizort oder Konzentration zu keiner signifikanten Veränderung im Antwortverhalten der untersuchten Neurone führte, wie dies bei Aktivierung der EP₁- und EP₂-Rezeptoren der Fall gewesen war.

4.7 Spinale Applikation des EP₄-Agonisten ONO-AE1-329

Zur Untersuchung des Einflusses einer Aktivierung spinaler Prostaglandinrezeptoren vom Subtyp EP₄ erfolgte eine Versuchsreihe, bei der nach Aufzeichnung einer Baseline mit der Trägerlösung für 25 min der spezifische EP₄-Agonist ONO-AE1-329 in drei ansteigenden Konzentrationen (1 ng/μl, 10 ng/μl, 100 ng/μl) spinal appliziert wurde, wobei jeweils nach 50 min die Konzentration um den Faktor 10 erhöht wurde.

Alle sieben untersuchten Neurone wiesen nach Applikation des Agonisten ein rezeptives Feld auf, welches Kniegelenk und Sprunggelenk umfasste, bei fünf dieser Zellen erstreckte sich das RF über Knie, Sprunggelenk und Pfote.

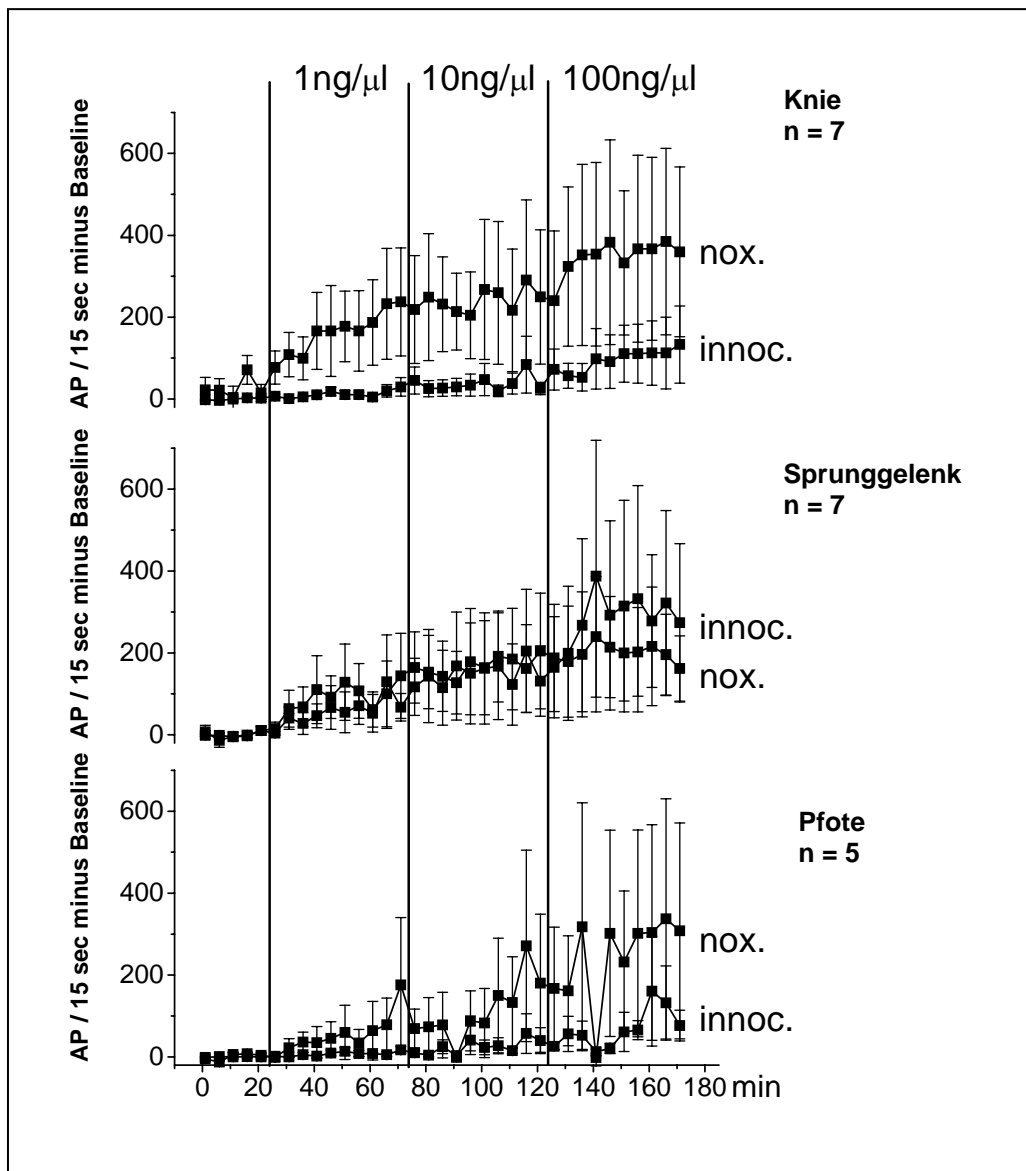
Tabelle 4.6 zeigt die über alle Experimente mit ONO-AE1-329 gemittelten Antwortraten je Konzentrationsblock.

Tabelle 4.6: über alle Versuche mit ONO-AE1-329 gemittelte AP / 15 sec \pm SEM (Standardfehler) in den jeweils letzten 25 min eines Stimulationsblockes; n (Knie, Sprunggelenk) = 7; n (Pfote) = 5

Reiz		Baseline	1 ng/ μ l	10 ng/ μ l	100 ng/ μ l
Knie (Knee)	nicht-noxisch	16 \pm 11	31 \pm 16	59 \pm 35	134 \pm 82
	noxisch	183 \pm 76	347 \pm 184	418 \pm 242	527 \pm 300
Sprunggelenk (Ankle)	nicht-noxisch	19 \pm 8	94 \pm 62	177 \pm 125	326 \pm 228
	noxisch	169 \pm 109	277 \pm 185	350 \pm 227	384 \pm 235
Pfote (Paw)	nicht-noxisch	4 \pm 3	14 \pm 7	36 \pm 24	104 \pm 65
	noxisch	23 \pm 12	106 \pm 78	187 \pm 145	325 \pm 244

Die Applikation von ONO-AE1-329 führte, bei einem angenommenen Signifikanzniveau von $p < 0.05$, bei nicht-noxischer Reizung am Kniegelenk ab einer Konzentration von 100 ng/ μ l, bei noxischer Reizung dagegen ab 1 ng/ μ l zum signifikanten Anstieg der Feuerraten (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen). Die Stimulation des Sprunggelenks führte ab einer Konzentration von 1 ng/ μ l zu einem signifikanten Anstieg der mittleren Feuerraten, lediglich bei Reizung der Pfote konnte, unabhängig von der Agonistenkonzentration, keine signifikante Veränderung des neuronalen Antwortverhaltens registriert werden.

Bei zwei der untersuchten Neurone konnte eine Ausdehnung des rezeptiven Feldes registriert werden. Bei einem untersuchten Neuron wurde nach der Gabe des EP₄-Agonisten ein Anstieg der Spontanaktivität von 0,07 auf 1,5 Hz beobachtet. Bei einem der untersuchten Neurone kam es durch die Absenkung der Reizschwelle zu dem Effekt, dass die Zelle nicht nur auf noxische Reizungen des Sprunggelenks reagierte, sondern nach Applikation des EP₄-Agonisten ebenfalls auf nicht-noxische Reize antwortete. Abbildung 4.9 zeigt den Verlauf des Antwortverhaltens der abgeleiteten Neurone bei nicht-noxischer sowie noxischer Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote (von oben nach unten).

**Abbildung 4.9:**

Zeitverlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone bei noxischer Reizung von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter Applikation des EP₄-Agonisten ONO-AE1-329; gemittelte Darstellung der Aktionspotentiale (AP) / 15 sec (Mittelwerte \pm Standardfehler) aller untersuchten Neurone unter mechanischer Stimulation; Baseline: 25 min; 3 Stimulationsblöcke à 50 min unter Applikation von ONO-AE1-329 (1 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, 100 ng/ μ l) nach 25, 75, 125 min; n = Anzahl der untersuchten Neurone: n (Knie) = 7, n (Sprunggelenk) = 7, n (Pfote) = 5

Am Beispiel des Kniegelenks wird in Abbildung 4.10 der durchschnittliche Anstieg der mittleren Feuerrate bezüglich der normierten Baseline dargestellt.

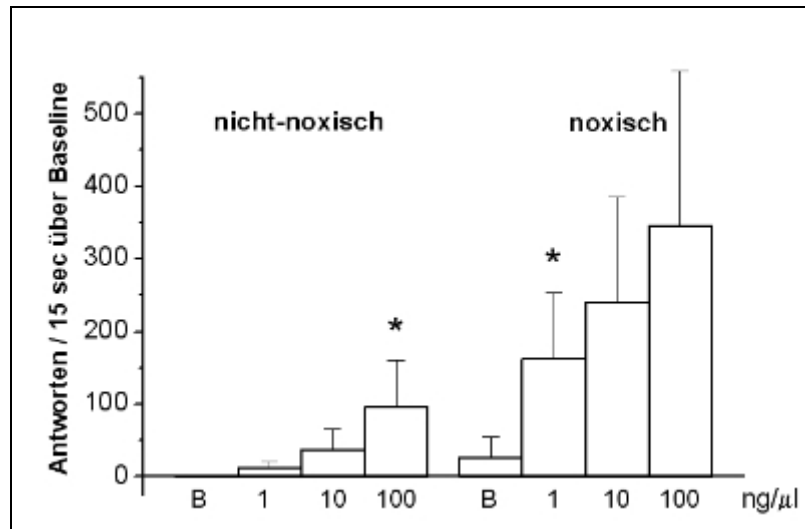


Abbildung 4.10:

Darstellung des durchschnittlichen Anstiegs der neuronalen Antwort auf Reizung des Kniegelenks im Vergleich zur Baseline. Jede Säule entspricht einem Konzentrationsblock von 50 min, die Sterne über den Säulen markieren die geringste Konzentration der EP₄-Agonisten, die zu einem signifikanten Anstieg der Entladungsrates in Bezug auf die Baseline führte.

Die Aktivierung des spinalen EP₄-Rezeptors mittels Applikation des spezifischen Agonisten ONO-AE1-239 führte also, ebenso wie die Aktivierung der Rezeptoren EP₁ und EP₂, zum gesteigerten Antwortverhalten auf nicht-noxische und noxische Reize. Lediglich bei Reizung der Pfote konnte der Einfluss von ONO-AE1-329 keine signifikante Veränderung der Antwortraten bewirken.

4.8 Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Im Rahmen der Versuche wurden insgesamt sechs verschiedene Substanzen bezüglich ihres Einflusses auf das Antwortverhalten nozizeptiver Rückenmarkneurone untersucht. Zusammengefasst traten folgende Effekte auf:

1. Die Trägersubstanz Tyrode führte bei Langzeitapplikation auf das Rückenmark zu keiner signifikanten Veränderung der Antwortrate nozizeptiver Rückenmarkneurone auf mechanische Reizung des Beins (vgl. Kapitel 4.2).
2. Die spinale Applikation von PGE₂ sowie der spezifischen Agonisten an den Rezeptoren EP₁, EP₂ und EP₄ steigerte die Entladungsrate der untersuchten

Neurone auf mechanische Stimulation. Des Weiteren wurde bei diesen Substanzen eine Ausdehnung des rezeptiven Feldes beobachtet (vgl. Kapitel 4.3, 4.4, 4.5, 4.7).

3. Der Agonist am EP₃-Rezeptor hatte keine signifikante Auswirkung auf die neuronale Antwort auf mechanische Reizung (vgl. Kapitel 4.6).

Die Bahnung des Antwortverhaltens durch die Aktivierung der EP₁, EP₂ und EP₄-Rezeptoren mittels Gabe der spezifischen Agonisten beinhaltete auch eine Senkung der Reizschwelle mit dem Effekt, dass bei einigen Zellen erst nach der Applikation der wirksamen Substanz durch mechanische Stimuli Antworten ausgelöst werden konnten. Dieser Effekt wurde bei drei Neuronen nach Gabe des EP₁-Agonisten, bei drei Neuronen nach Gabe des EP₂-Agonisten und bei einem Neuron nach Gabe des EP₄-Agonisten beobachtet.

5 Diskussion

5.1 Versuchsdurchführung

Trotz der Anwendung einer standardisierten Untersuchungsmethode gab es bei der Durchführung der Untersuchungen mehrere Faktoren, die theoretisch Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben könnten.

5.1.1 in-vivo-Experimente

Bei der hier vorgestellten Arbeit wurden in-vivo-Experimente durchgeführt, deren Vorteil unter anderem darin liegt, dass rezeptive Felder von Neuronen direkt auf Ausdehnung und Veränderung untersucht werden können, was bei in-vitro-Untersuchungen an isolierten Zellen / Zellverbänden nicht möglich wäre. Außerdem ist durch die in-vivo-Ableitung im Gegensatz zur in-vitro-Untersuchung einzelner Zellen (Dauer ca. 15 min) eine Langzeitbeobachtung des Neurons (über mehrere Stunden) möglich. Dies ermöglicht zum Beispiel auch eine vorher-nachher-Betrachtung des Zellverhaltens im Verlauf einer Entzündung. Des Weiteren bietet die in-vivo-Untersuchung die Möglichkeit der Beobachtung der neuronalen Antwort im Gesamtsystem, was jedoch aufgrund zahlreicher Einflussgrößen je nach Fragestellung auch von Nachteil sein kann.

Die von uns durchgeführten in-vivo-Ableitungen weisen jedoch auch einige Nachteile auf: Da immer nur ein Neuron auf einmal untersucht werden konnte, wurde für jede untersuchte Zelle ein Versuchstier benötigt, was aufgrund des hohen operativen und apparativen Aufwandes dazu führte, dass nur eine relativ geringe Anzahl an Neuronen untersucht werden konnte. Ein weiterer Nachteil der in-vivo-Ableitungen ist, dass im Gegensatz zur in-vitro-Untersuchung isolierter Neurone, die Testsubstanzen nicht direkt an der Zelle appliziert werden können, sondern nur auf die Oberfläche des Rückenmarks. Daraus resultiert, dass die Substanzen erst durch Diffusion zum Wirkort, der zudem nicht genau bekannt ist, gelangen müssen und die genaue Konzentration des Wirkstoffes am Neuron nach einer Diffusionsstrecke von ca. 1000µm unklar ist.

5.1.2 Anästhesie und Präparation

Zunächst musste bei den Versuchstieren eine Allgemeinanästhesie durch i. p. Injektion von Thiopental eingeleitet und über die Dauer des gesamten Experiments aufrechterhalten werden. Obwohl Thiopental im Gegensatz zu anderen Anästhetika vorwiegend hypnotisch und nicht analgetisch (wie z. B. Ketamin) wirkt, ist eine Beeinflussung des neuronalen Antwortverhaltens vorstellbar. Um diese möglichst gering zu halten, aber gleichzeitig eine für die Durchführung des Experiments ausreichende Narkosetiefe zu erreichen, wurde die Narkosetiefe regelmäßig überprüft (z. B. Überprüfung von Corneal- und Wegziehreflexen) und die Anästhesie in regelmäßigen Abständen durch die i. p. Injektion von kleinen Erhaltungsdosen aufrecht erhalten. Hierzu sei jedoch angemerkt, dass sich durch einen unterschiedlichen Sympathikotonus bei den einzelnen Tieren sowie die nur ungenaue Messbarkeit der Narkosetiefe Schwankungen bei der verwendeten Menge des Narkosemittels ergeben konnten.

Weiterhin war eine umfangreiche operative Präparation der Versuchstiere mit Laminektomie, Entfernung der Dura mater, Tracheostomie etc. erforderlich (s. Kapitel 3.2.2), welche, wie in der Literatur beschrieben, ebenfalls Auswirkungen auf das Verhalten der untersuchten Zellen haben kann (Hartell & Headley, 1990). Um diese Auswirkungen zu minimieren, wurde bei der Präparation der Tiere auf eine möglichst geringe Gewebetraumatisierung sowie einen geringstmöglichen Blutverlust geachtet.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss also die Tatsache berücksichtigt werden, dass ein Einfluss von Narkose und Operation auf die neuronale Antwort möglich ist.

Da sich jedoch die Durchführung einer Anästhesie und die Präparation der Versuchstiere bei den hier vorgestellten Versuchen nicht vermeiden ließen und bei allen Versuchstieren standardisiert durchgeführt wurden, werden die Ergebnisse dadurch statistisch nicht verfälscht (systemischer Fehler).

5.1.3 Eigenschaften der untersuchten Neuronen

Das Ziel der Versuche war die Untersuchung von Neuronen mit Afferenzen aus dem Kniegelenk. Bei der Auswahl eines geeigneten Neurons musste der Umstand berücksichtigt werden, dass viele Neurone im Rückenmark neben Einstrom vom Gelenk auch afferenten Input von Haut und Muskulatur erhalten (Schaible et al., 1987). Für die Untersuchungen waren jedoch ausschließlich Zellen mit Afferenzen aus dem Kniegelenk gesucht, deren rezeptives Feld keine Haut über dem Knie beinhalten sollte. Bei der

Auswahl eines geeigneten Neurons musste sich dieses deutlich von der Hintergrundaktivität abheben und die mechanische Stimulation der Haut über dem Kniegelenk (Bestreichen, Zwicken) sollte keine Antwort auslösen.

Der Hauptanteil dieser Neurone lag im tiefen Hinterhorn (Laminae IV-VI), obwohl auch in oberflächlichen Schichten (Lamina I) zahlreiche Zellen mit Afferenzen aus dem Knie gefunden wurden. Die oberflächlich gelegenen Zellen erhielten jedoch häufig auch afferenten Input von der Haut und waren deshalb meist nur schwer von anderen Neuronen abgrenzbar, so dass in den Untersuchungen nur Neurone in den tieferen Laminae untersucht wurden. Diese wurden im Durchschnitt in 929 μm Tiefe aufgefunden. Unter den 31 untersuchten Zellen fanden sich 25 (81%) WDR-Neurone und sechs (19%) HT-Neurone. Die Tiefenlokalisation erfolgte mithilfe eines Mikrosteppers (s. Kapitel 3.4.1). In verschiedenen älteren Studien war die Exaktheit dieser Tiefenbestimmung mittels histologischer Auswertung nach Injektion von Farbstoffen untersucht und belegt worden (Grubb et al., 1993; Neugebauer & Schaible, 1988, 1990). Zur genauen Bestimmung musste mittels Mikrostepper die Elektrode auf die Oberfläche des Rückenmarks aufgesetzt werden und so die Ausgangsposition der Elektrode (Tiefe: 0 μm) definiert werden. Bei Betrachtung dieses Vorgangs der exakten Elektrodenpositionierung muss von einer geringen Varianz durch verschiedene Faktoren ausgegangen werden (Atembewegungen des Tieres, ungünstiger Betrachtungswinkel), welche jedoch für die statistische Auswertung des Experiments keine Rolle spielt.

5.1.4 Mechanische Stimulation

Die Applikation der mechanischen Stimuli erfolgte standardisiert (s. Kapitel 3.4.1), d. h. die nicht-noxischen und noxischen Reize sollten immer mit gleicher Stärke auf die gleichen Stellen (Kniegelenksspalt, Sprunggelenk, Pfote) ausgeübt werden.

Hier ist von mehreren potentiellen Einflussgrößen auf das Antwortmuster der untersuchten Zellen auszugehen. Zur Reizung des Kniegelenks wurde ein am stereotaktischen Rahmen befestigter, kalibrierter Stempel verwendet, welcher um eine fixe Achse rotierte und vom Versuchsleiter unter stetiger Ablesung der Skala manuell für 15 Sekunden mit konstanter Kraft gegen das Knie des Tieres gedrückt werden musste, wobei von einer gewissen Streubreite im jeweils ausgeübten Druck auszugehen ist. Des Weiteren ist es möglich, dass die häufigen Wiederholungen der Stimulation zu Minimalbewegungen im Bein der Ratte und damit zu einer Verschiebung des genauen Reizungsortes führten. Die Stimulationen

von Sprunggelenk und Pfote erfolgten mittels modifizierter Krokodilklemmen, welche zur Stimulation immer auf die gleichen Stellen gesetzt werden mussten. Hier unterlag die genaue Positionierung ebenfalls einer Ungenauigkeit.

Die hier aufgeführten Faktoren sind jedoch als systemischer Fehler ohne statistischen Einfluss auf das Gesamtergebnis der Versuche zu sehen, da sie bei allen durchgeführten Experimenten in gleichem Maße auftreten konnten.

5.1.5 Spinale Applikation der Testsubstanzen

Um die zu untersuchenden Substanzen möglichst genau auf das abgeleitete Segment applizieren zu können, wurde ein aus einem Gummiring bestehender Pool von etwa 30 μl Volumen auf das Rückenmark aufgesetzt und mit Silikongel abgedichtet (s. Kapitel 3.4.1). Der Pool konnte dann mit den unterschiedlichen Testsubstanzen befüllt werden.

Um ein Austreten der Testsubstanzen aus dem Pool auf das angrenzende Rückenmark zu vermeiden, musste dieser möglichst passgenau auf das Rückenmark aufgesetzt werden. Da jedoch trotzdem ein Austritt von Testsubstanzen vorstellbar ist, was möglicherweise zu einer Verringerung der Wirkstoffdosis am untersuchten Neuron führen konnte, wurde der Pool von außen mit Agar gegen ein mögliches Auslaufen versiegelt, was zudem eine mechanische Stabilisierung des gesamten Untersuchungsareals zur Folge hatte.

5.1.6 Untersuchung der EP-Agonisten

Da die untersuchten EP-Agonisten mit unterschiedlichen K_i - bzw. IC_{50} -Werten verschiedene Rezeptoraffinitäten aufwiesen, wurden sie in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen appliziert.

Bei spinaler Applikation der unterschiedlichen EP-Agonisten ist unklar, in welchen Konzentrationen die Substanzen direkt an den untersuchten Neuronen im tiefen Hinterhorn (Ableitungsort in ca. 1000 μm Tiefe) vorliegen, es ist jedoch davon auszugehen, dass die Agonistenkonzentration im Gewebe mit zunehmender Tiefe abnimmt. Um trotz der angenommenen Barrieren eine gesicherte Rezeptorbindung zu gewährleisten, waren die verwendeten Konzentrationen zum Teil erheblich größer als die EC_{50} -Werte der einzelnen Rezeptoren. So werden von verschiedenen Arbeitsgruppen weltweit auch an isolierten Hinterwurzel-Ganglienzellen, wo von geringeren Diffusionshindernissen als *in situ*

auszugehen ist, Konzentrationen von 1-2,5 μM verwendet, welche somit ebenfalls höher als die jeweiligen EC_{50} -Werte liegen.

Folgende Konzentrationsbereiche wurden bei Gabe der einzelnen Agonisten abgedeckt:

- ONO-DI-004: 0,1 ng/ μl (2,36 μM) – 100 ng/ μl (2,36 mM); EC_{50} -Wert: 0,42 μM
- Butaprost: 0,1 ng/ μl (2,44 μM) – 100 ng/ μl (2,44 mM); EC_{50} -Wert: 5 μM
- ONO-AE-248: 1 ng/ μl (26,28 μM) – 100 ng/ μl (2,628 mM); EC_{50} -Wert: 0,0052 μM
- ONO-AE1-329: 1 ng/ μl (21,9 μM) – 100 ng/ μl (2,19 mM); EC_{50} -Wert: 0,0031 μM

5.1.7 Dauer der Applikation

Die Agonisten wurden jeweils für die Dauer von 50 Minuten im Pool belassen und dann mit einer Pipette abgesaugt, bevor nach einer Spülung des Pools mit der Trägerlösung die nächst höhere Konzentration appliziert wurde. Die Dauer eines Stimulationsblockes wurde aus mehreren Gründen auf 50 min festgelegt: Zum einen aus empirischen Überlegungen, denn nach diesem Zeitraum konnten bereits Effekte der applizierten Substanzen beobachtet werden. Zum anderen konnte bei diesem relativ kurzen Zeitraum unter Berücksichtigung einer Diffusionszeit der Substanz bis in ca. 1000 μm Tiefe von einer direkten Wirkung der Substanzen am Rezeptor ausgegangen werden und nicht von möglichen sekundären Effekten wie z. B. Genexpression.

Vasquez et al. (2001) hatten in ihrer Studie bei ähnlichem Versuchsaufbau versucht, die Wirkung von spinal appliziertem PGE_2 auf nozizeptive Neurone durch Ausspülen des Pools aufzuheben, was jedoch nicht vollständig gelungen war, denn die durch PGE_2 vermittelte Steigerung der neuronalen Entladungsrates fielen nach dem Auswaschen zwar wieder ab, allerdings nicht mehr bis auf das Ausgangsniveau. Dies könnte jedoch auch auf Sekundärwirkungen von PGE_2 zurückzuführen sein. Da in unserer Studie der Pool zwischen den jeweiligen Konzentrationsblöcken nur kurz ausgespült wurde, und folglich nur von einer Entfernung der Testsubstanz an der Oberfläche des Rückenmarks, jedoch nicht im Gewebe auszugehen ist, ist hier mit einem Kumulativeffekt der hintereinander in aufsteigenden Konzentrationen applizierten Substanzen zu rechnen. Da dieser jedoch bei allen Versuchen in gleichem Maße mit zu berücksichtigen ist, ergibt sich daraus kein Einfluss für die statistische Auswertung.

5.2 Der Einfluss von PGE₂ auf das neuronale Antwortverhalten

Durch die spinale PGE₂-Gabe kam es zu einer Steigerung des neuronalen Antwortverhaltens auf mechanische Stimulation im Sinne einer Erhöhung der Entladungsrate, einer Absenkung der Reizschwelle sowie einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes.

Vasquez et al. (2001) hatten in ähnlichen Untersuchungen ebenfalls in-vivo-Ableitungen bei Ratten durchgeführt und unter mechanischer Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote PGE₂ auf das Rückenmark appliziert, was zu einem Anstieg der neuronalen Antwortrate sowie zu einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes führte.

Die Ergebnisse von Vasquez et. al (2001) stimmen dahingehend mit unseren überein, dass die topische Gabe von PGE₂ primär zu einem gesteigerten Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone führt (zu den Wirkmechanismen von PGE₂ siehe Kapitel 2.6.2). Man muss allerdings anmerken, dass die Arbeitsgruppe kurzzeitige, akute Effekte untersuchte, während wir in unserer Studie den Effekt einer länger andauernden PGE₂-Applikation für 150 min untersucht hatten.

In unserer Untersuchung war es über den gesamten Untersuchungszeitraum zu einem kontinuierlichen Anstieg der neuronalen Feuerraten gekommen, während die Feuerraten in der Studie von Vasquez et al. (2001) unter der Entfernung der PGE₂-Lösung mittels Ausspülen langsam wieder absanken, jedoch meist nicht bis auf das Ausgangsniveau. Die beiden Studien lassen vermuten, dass der Effekt von Prostaglandin E₂ mit der Dauer der Einwirkung korreliert, d. h. die gesteigerte Entladungsfrequenz tritt so lange auf, wie PGE₂ lokal vorhanden ist, und nimmt bei Abnahme der PGE₂-Konzentration wieder ab, was für eine teilweise rezeptorvermittelte Wirkung von PGE₂ in diesem Zeitfenster spricht. Möglicherweise führt die PGE₂-Applikation jedoch auch zu Sekundäreffekten, welche ebenfalls die neuronale Antwort beeinflussen könnten.

Erwähnenswert ist eine weitere Untersuchungsreihe von Vasquez et al. (2001), in der die spinale Applikation von PGE₂ 7 – 11 h nach Induktion einer Kniegelenksentzündung zu einer geringeren Steigerung der neuronalen Antwort führte, als unter nicht-entzündlichen Bedingungen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die PGE₂-Konzentration unter entzündlichen Bedingungen ohnehin erhöht ist und somit durch zusätzliche spinale PGE₂-Applikation nicht in gleichem Umfang gesteigert werden kann, wie unter Normalbedingungen.

In der Literatur finden sich viele weitere Studien bezüglich des Einflusses von PGE₂ auf das neuronale Antwortverhalten, wie z. B. die patch-clamp-Studie von Baba et al. (2001), bei der es unter dem Einfluss von PGE₂ zu einer Senkung der Depolarisationsschwelle von isolierten Hinterhornneuronen auf Input von Primäraffenzen kam, was für einen direkten postsynaptischen Einfluss von PGE₂ auf das Depolarisationsverhalten von Hinterhornneuronen spricht. Baba et al. (2001) postulieren damit eine wichtige Rolle von PGE₂ bei der Ausbildung einer zentralen Sensibilisierung, und obwohl diese Arbeitsgruppe ein anderes Versuchsmodell als wir verwendet hatte (in-vitro-Untersuchung, elektrische Stimulation der Neurone), gehen deren Ergebnisse mit unseren eigenen konform.

Die Sensibilisierung, die wir in unserer Studie fanden, spiegelt sich tatsächlich auch im Verhalten von Versuchstieren wider. So beschreiben z. B. Minami et al. (1994) das Auftreten von Allodynie und Hyperalgesie bei mechanischen Stimuli nach intrathekaler Gabe von PGE₂. Möglicherweise wird die Entstehung einer Sensibilisierung auch durch eine tonische spinale Prostaglandinproduktion beeinflusst, wie sie von Taiwo & Levine (1988) beschrieben wird. Diese Arbeitsgruppe postuliert des Weiteren eine PGE₂-vermittelte Blockierung bulbospinaler Projektionsneurone, welche an Schmerzkontroll-Regelkreisen beteiligt sind. Dies führt zur Hyperalgesie und könnte ebenfalls einen Erklärungsansatz für die von uns beschriebene Übererregbarkeit liefern.

Während in der Literatur weitgehend Übereinstimmung bezüglich des Einflusses von Prostaglandin E₂ auf Nozizeption und Schmerz besteht, konnte in unserer Studie diese Wirkung von PGE₂ ebenfalls bestätigt werden und zudem nachgewiesen werden, dass in einem Testzeitraum von 150 min PGE₂ keinen Wirkungsverlust bezüglich des Einflusses auf die Antwort nozizeptiver Neurone zeigt.

Um genauere Information darüber zu erhalten, wie die PGE₂-Wirkung vermittelt wird, untersuchten wir in unserer Studie die spinalen PGE₂-Rezeptoren EP₁ - EP₄ im Einzelnen.

Unsere Untersuchungen von Hinterhorn-Ganglienzellen am lebenden Tier stehen dabei thematisch und methodisch zwischen den Verhaltensuntersuchungen sowie den Untersuchungen an isolierten Neuronen und schließen damit die Lücke zwischen diesen anderen Studientypen.

5.3 Die Bedeutung des EP₁-Rezeptors

Um den Einfluss einer Aktivierung des spinalen EP₁-Rezeptors auf das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone zu untersuchen, wurde unter mechanischer Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote ein spezifischer Agonist am EP₁-Rezeptor (ONO-DI-004) in steigenden Konzentrationen auf das Rückenmark appliziert. Bereits ab 2,36 μM war ein signifikanter Einfluss des EP₁-Agonisten auf die neuronale Entladungsrate sowie die Ausdehnung des rezeptiven Feldes erkennbar. In unseren Untersuchungen zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des Agonisteneffekts.

Obwohl der EP₁-Rezeptor bisher als überwiegend präsynaptisch angesehen wurde (Oida et al., 1995), trat als Folge seiner Aktivierung mit der Vergrößerung des rezeptiven Feldes auch ein zentraler Effekt auf, was jedoch möglicherweise durch eine EP₁-vermittelte, verstärkte Ausschüttung von Transmittern wie z. B. Glutamat verursacht worden sein könnte.

Während wir in unserer Studie die Auswirkungen einer EP₁-Aktivierung auf die Nozizeption unter Normalbedingungen untersuchten, führten Nakayama et al. (2002) eine Studie an Ratten mit Carrageenan-induzierter Entzündung der Hinterpfote durch, die weiteren Aufschluss über die Funktion des EP₁-Rezeptors brachte. Sie fanden nach Induktion der peripheren Entzündung neben einer Erhöhung des PGE₂-Spiegels eine Erhöhung der Calciumkonzentration sowie die Ausbildung einer Hyperalgesie. Durch die intrathekale Gabe des spezifischen EP₁-Antagonisten ONO-8711 konnten die drei oben genannten Entzündungsfolgen (PGE₂-Anstieg, Ca²⁺-Erhöhung, Hyperalgesie) unterdrückt werden. Die Untersuchungen führten Nakayama et al. (2002) zu dem Schluss, dass die Aktivierung des EP₁-Rezeptors durch PGE₂ eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer mechanischen Hyperalgesie während einer peripheren Entzündung spielt.

Minami et al. (2001) untersuchten in einer Studie die Auswirkungen von intrathekal appliziertem PGE₂ bei knockout-Mäusen mit fehlendem EP₁- bzw. EP₃-Rezeptor. Intrathekal appliziertes PGE₂ führte bei allen normalen Mäusen sowie bei denen mit fehlendem EP₃-Rezeptor zur Ausbildung von Allodynie, jedoch nicht bei Mäusen mit fehlendem EP₁-Rezeptor, wohingegen die direkte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mittels i. t. Applikation von NMDA auch bei diesen Mäusen eine mechanische Allodynie zur Folge hatte. Dies führte zu der Annahme, dass durch Bindung von PGE₂ am präsynaptischen EP₁-Rezeptor eine Ausschüttung von Neurotransmittern aus der Präsynapse

erfolgt, welche eine Aktivierung des postsynaptischen NMDA-Rezeptors mit nachfolgender Allodynie vermitteln (Minami et al., 2001).

Generell muss bei Untersuchungen der EP-Rezeptoren mittels Verhaltenstests berücksichtigt werden, dass die in diesen Versuchen gemessenen motorischen Reaktionen der Versuchstiere (z. B. Pfotenwegziehreflex) möglicherweise auch durch EP-Rezeptoren auf Motoneuronen beeinflusst werden könnten.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der hier beschriebenen Verhaltensstudien (Minami et al., 2001; Nakayama et al., 2002) auf EP₁-vermittelte Mechanismen im Hinterhorn hin, während wir in unserer Studie neben der Steigerung der Antwortraten nozizeptiver Hinterhornneurone ebenfalls eine zentral vermittelte EP₁-Wirkung nachweisen konnten, welche in einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes resultierte. Da unsere Untersuchungen der EP₂- sowie EP₄-Rezeptoren allerdings zu ähnlichen Ergebnissen führten (s. u.), nimmt der EP₁-Rezeptor unserer Ansicht nach nicht zwingend die z. B. von Nakayama et al. (2002) postulierte Schlüsselstellung für die Ausbildung einer entzündungsbedingten Hyperalgesie ein.

5.4 Die Bedeutung des EP₂-Rezeptors

Die Aktivierung der spinalen EP₂-Rezeptoren mittels lokaler Applikation des spezifischen EP₂-Agonisten Butaprost führte bei nicht-noxischer sowie noxischer Reizung des Kniegelenks ab einer Konzentration von 0,1 ng/μl zu einem signifikanten Anstieg der neuronalen Entladungsraten. Auch bei Reizung von Sprunggelenk und Pfote kam es tendenziell zu einem Anstieg der Antwortrate, jedoch ergeben sich aufgrund der geringen Stichprobengröße ($n_{\text{(Sprunggelenk; Pfote)}} = 2$) keine statistisch bedeutsamen Unterschiede. Anhand unserer Studie kann keine Aussage darüber getroffen werden, worin die Steigerung der neuronalen Entladungsrate durch die Applikation von Butaprost begründet liegt. Dies könnte durch die nachfolgend beschriebenen Studien, wie z. B. die patch-clamp-Studien von Baba et al. (2001) und Ahmadi et al. (2002) oder die Verhaltensstudie von Reinold et al. (2005) geklärt werden.

Baba et al. (2001) fanden an tiefen Hinterhornneuronen eine durch PGE₂ am postsynaptischen EP₂-Rezeptor vermittelte Öffnung unselektiver Kationenkanäle mit nachfolgender Depolarisation, was zur Absenkung des Schwellenpotentials für die Auslösung von Aktionspotentialen führte. Ahmadi et al. (2001) gehen davon aus, dass

PGE₂ in niedrigeren Konzentrationen außerdem eine Hemmung Glycin-Rezeptor-vermittelter inhibitorischer Strömungen (IPSC) mit resultierender zentraler Sensibilisierung hervorruft, während zur direkten Auslösung einer Depolarisation an Hinterhornneuronen eine deutlich höhere PGE₂-Konzentration vorhanden sein muss. Die spinalen Glycin-Rezeptoren üben eine hemmende Wirkung auf das nozizeptive System im Rückenmark aus und die Inhibierung dieser Glycin-Rezeptoren liegt der Ausbildung einer (inflammatorischen) spinalen Hyperalgesie zugrunde (Harvey et al., 2004).

Beide Studien (Baba et al., 2001; Ahmadi et al., 2001) beschreiben die jeweils beschriebenen PGE₂-Effekte als postsynaptisch, außerdem war in beiden Arbeiten die PGE₂-Wirkung durch die Gabe des selektiven EP₂-Agonisten Butaprost imitierbar, was die Autoren zu dem Schluss führte, dass die PGE₂-Wirkung direkt über den postsynaptischen EP₂-Rezeptor vermittelt wird.

Reinold et al. (2005) führten Verhaltensuntersuchungen an knockout-Mäusen durch, in denen die i. t. Applikation von PGE₂ bei Tieren mit defektem EP₂-Rezeptor im Gegensatz zu wild-type-Mäusen keine thermale oder mechanische Sensibilisierung zur Folge hatte. Des Weiteren wies die Arbeitsgruppe wie bereits vorher Ahmadi et al. (2001) mittels patch-clamp-Verfahren eine über Bindung von PGE₂ am EP₂-Rezeptor vermittelte Inhibierung glycinерger Neurotransmission nach. Zusammenfassend kamen Reinold et al. (2005) zu dem Ergebnis, dass der postsynaptische EP₂-Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer entzündungsbedingten spinalen Hyperalgesie spielt.

Trotz unterschiedlicher Methoden besteht bei den hier beschriebenen Studien (Baba et al., 2001; Ahmadi et al., 2001; Reinold et al., 2005) dahingehend Übereinstimmung, dass PGE₂ seine Effekte (neuronale Übererregbarkeit, zentrale Sensibilisierung, spinale Hyperalgesie) postsynaptisch über Bindung am EP₂-Rezeptor vermittelt.

Zusammenfassend kann bezüglich der hier diskutierten Ergebnisse angenommen werden, dass der EP₂-Rezeptor maßgeblich an der Ausbildung einer spinalen Übererregbarkeit, wie sie bei Entzündung entstehen kann, beteiligt ist. Möglicherweise könnte die spezifische Blockierung des EP₂-Rezeptors Bestandteil einer gezielten Therapie entzündlicher Gelenkschmerzen werden (Reinold et al., 2005).

5.5 Die Bedeutung des EP₃-Rezeptors

Die spinale Applikation des spezifischen EP₃-Rezeptor-Agonisten ONO-AE-248 führte unter nicht-noxischer und noxischer mechanischer Stimulation an Knie, Sprunggelenk und Pfote zu keiner signifikanten Veränderung im Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone.

In einer Studie von Shibuya et al. (2002) bewirkte die Gabe des EP₃-Agonisten ONO-AE-248 im Gegensatz zur PGE₂-Applikation keinen signifikanten exzitatorischen Effekt auf Neurone des Nucleus supraopticus, was, obwohl andere Zellen als in dieser Arbeit untersucht wurden, unserem Ergebnis entspricht.

In Fortführung unserer Studie untersuchten Bär et al. (2004) den Effekt des EP₃-Agonisten ONO-AE-248 auf das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone während einer peripheren Entzündung und kamen zu dem Ergebnis, dass die Wirkung des EP₃-Rezeptors vom cAMP-Spiegel abhängig ist, dessen Erhöhung bekanntermaßen eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer spinalen Übererregbarkeit spielt (Cerne et al., 1992). In den Untersuchungen hatte die spinale Applikation des EP₃-Agonisten unter entzündlichen Bedingungen bzw. bei PGE₂-induzierter Übererregbarkeit zu einer Absenkung der neuronalen Antwortrate auf mechanische Stimulation des Kniegelenks geführt, jedoch unter Normalbedingungen keinen Einfluss auf die Entladungsfrequenz gezeigt. Um potentiell gegensätzliche Wirkungen von PGE₂ und dem EP₃-Agonisten zu verifizieren, untersuchten Bär et al. (2004) in einer weiteren Versuchsreihe die Interaktion zwischen PGE₂ und dem EP₃-Agonisten in isolierten Hinterwurzelganglien. Während PGE₂ durch eine Schwellenverschiebung die Öffnung Tetrodotoxin (TTX)-resistenter Natriumkanäle bahnte, verhinderte der EP₃-Agonist, allerdings nur unter zeitgleicher Applikation mit PGE₂, diesen Effekt. Der Agonist alleine hatte keinen Einfluss auf die Na⁺-Ströme. Zusammenfassend zeigte die Studie von Bär et al. (2004), dass über den EP₃-Rezeptor neuronale Antworten gehemmt werden können, die entweder durch Entzündung oder durch PGE₂-Applikation ausgelöst wurden.

Hasegawa et al. (1996) fanden in ihrer Arbeit heraus, dass der nach Forskolin-Applikation erhöhte cAMP-Spiegel in Ovarialzellen von Hamstern über den EP_{3α}-Rezeptor reguliert wird, während die EP_{3α}-Rezeptor-vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase unter normalen Bedingungen keinen Einfluss auf das neuronale Antwortverhalten hat. In unserer Arbeit hatte die Gabe des EP₃-Agonisten vermutlich deshalb keinen Einfluss auf das

neuronale Antwortverhalten, weil der cAMP-Spiegel bei unseren Versuchen mit normalen Tieren nicht erhöht war.

Im Kontrast zu unseren Ergebnissen stehen die beiden folgenden Studien: Während Minami et al. (2001) in ihrer Arbeit postulieren, dass PGE₂ über Wirkung am EP₃-Rezeptor Hyperalgesie vermittelt, beschreiben Kumazawa et al. (1993, 1996) eine EP₃-Rezeptor-vermittelte Steigerung neuronaler Antworten in peripheren Nerven. Dass wir im Gegensatz dazu in unserer Studie keine Sensibilisierung durch Gabe des EP₃-Agonisten sehen konnten, liegt möglicherweise daran, dass in unserem System vermutlich vor allem eine inhibitorische Isoform des EP₃-Rezeptors (EP_{3α}) vorlag, während bei Minami et al. (2001) und Kumazawa et al. (1993, 1996) die Wirkung des exzitatorisch wirkenden EP_{3β}-Rezeptors überwog.

Unter der Annahme des Überwiegens des inhibitorischen EP_{3α}-Rezeptors könnte sich auch begründen lassen, dass die Applikation des spezifischen EP₃-Agonisten bei uns möglicherweise deshalb zu keiner signifikanten Veränderung der neuronalen Antwort führte, weil der präsynaptische EP_{3α}-Rezeptor seine Funktion in Form einer Senkung des cAMP-Spiegels mit resultierender Unterdrückung der neuronalen Entladungsrate vermutlich erst dann vermittelt, wenn ein durch PGE₂-Einfluss oder Entzündung erhöhter cAMP-Spiegel vorliegt.

5.6 Die Bedeutung des EP₄-Rezeptors

Die lokale Applikation des spezifischen Agonisten am EP₄-Rezeptor, ONO-AE1-329, ergab unter nicht-noxischer und noxischer Stimulation von Knie und Sprunggelenk eine signifikante Erhöhung der Entladungsfrequenz nozizeptiver Hinterhornneurone sowie eine Vergrößerung des rezeptiven Feldes. Bei Reizung der Pfote zeigte sich zwar tendenziell ebenfalls eine Erhöhung der Antwortrate, diese wurde jedoch aufgrund der zu geringen Stichprobengröße statistisch nicht bedeutsam.

Southall & Vasko (2001) wiesen mittels PCR EP_{3C}- und EP₄-Rezeptoren auf DRG-Neuronen nach und kamen zu dem Schluss, dass die PGE₂-induzierte Sensibilisierung von DRG-Neuronen über EP_{3C}- und EP₄-Rezeptoren vermittelt wird. Unter der Annahme einer erhöhten Transmitterausschüttung nach der PGE₂-induzierten DRG-Neuron-Sensibilisierung erklärt sich auch die von uns auf der spinalen (= postsynaptischen) Seite gefundene Erhöhung der neuronalen Antwortrate nach Gabe des EP₄-Agonisten.

Im Kontrast zu unserer Arbeit steht eine Studie von Omote et al. (2002), die die Auswirkungen einer peripheren Applikation des spezifischen EP₄-Agonisten ONO-AE1-329 unter entzündlichen Bedingungen untersuchten und einen Rückgang von Entzündungsmerkmalen wie Hyperalgesie oder Schwellung fanden. Unter Normalbedingungen zeigte der EP₄-Agonist keinen Effekt. Der EP₄-Rezeptor war in der Peripherie im Gegensatz zum Rückenmark also nicht in der Lage, eine Sensibilisierung bzw. entzündliche Hyperalgesie zu erzeugen. Der EP₄-Rezeptor (ähnlich dem EP_{3α}-Rezeptor) scheint seine Rolle unter entzündlichen Bedingungen zu ändern, des Weiteren spielt der Wirkungsort des EP₄-Agonisten (zentral *versus* peripher) hier vermutlich eine entscheidende Rolle.

Für einen Einfluss der Rahmenbedingungen auf die Auswirkung einer Aktivierung des EP₄-Rezeptors spricht auch, dass Bär et al. (2004) in ihrer Studie unter entzündlichen Bedingungen keine Beeinflussung der neuronalen Aktivität im Rückenmark durch Gabe des EP₄-Agonisten ONO-AE1-329 fanden. Dieses Ergebnis könnte sich allerdings unter der Annahme mit unserer Studie in Einklang bringen lassen, dass die EP₄-vermittelte cAMP-Erhöhung unter normalen Bedingungen zum Anstieg der neuronalen Feuerrate führt, unter entzündlichen Bedingungen im Sinne eines steady-state jedoch möglicherweise nicht gesteigert werden kann, weshalb die bereits erhöhte Feuerrate nicht weiter beeinflusst wird.

5.7 Zusammenfassende Diskussion aller Ergebnisse

In unserer Studie wurde die Auswirkung der spinalen Applikation von PGE₂ und spezifischen Agonisten an den spinalen PGE₂-Rezeptoren (EP₁-EP₄) auf das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone unter mechanischer Stimulation untersucht.

Wie andere Autoren, z. B. Vasquez et al. (2001) aus unserer eigenen Arbeitsgruppe oder Baba et al. (2001), fanden wir in unserer hier beschriebenen Studie eine durch spinale PGE₂-Applikation induzierte Steigerung der neuronalen Erregbarkeit. Andere Autoren beschreiben die PGE₂-vermittelte Ausbildung von Hyperalgesie und Allodynie (Minami et al., 1994). PGE₂ bewirkt eine Änderung der Reizschwelle von Hinterhornneuronen, was entweder durch direkte Wirkung an den Neuronen und / oder durch die Blockierung inhibitorischer bulbospinaler Projektionsneurone bedingt sein könnte (Taiwo & Levine, 1988). Innerhalb von 150 min zeigte sich bei der PGE₂-Gabe kein Wirkungsverlust, jedoch

kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Bedeutung von PGE₂ in größeren Zeitfenstern ändert.

Da davon auszugehen war (und von unserer Arbeitsgruppe mittlerweile auch nachgewiesen wurde), dass alle vier EP-Rezeptoren im Rückenmark vorhanden sind, stellte sich für uns die Frage, welche EP-Rezeptoren in welchem Maße zu der Vermittlung der PGE₂-Antwort im normalen Tier beitragen.

Die spinale Applikation des spezifischen EP₁-Agonisten ONO-DI-004 bewirkte unter mechanischer Stimulation einen signifikanten Anstieg der neuronalen Antwortrate und als Zeichen einer zentralen Sensibilisierung eine Ausdehnung des rezeptiven Feldes. Der EP₁-Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration führt, konnte also die gleichen Effekte wie PGE₂ induzieren und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündungsbedingter PGE₂-induzierter spinaler Hyperalgesie und Allodynie (Minami et al., 2001; Nakayama et al., 2002), wenngleich die Beteiligung anderer EP-Rezeptoren bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsschmerz nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei der Untersuchung des EP₂-Rezeptors zeigte sich, dass dieser ebenfalls die PGE₂-Wirkungen vermitteln konnte, was unter mechanischer Reizung in einer neuronalen Übererregbarkeit sowie einer zentralen Sensibilisierung resultierte. Dies könnte durch eine direkte EP₂-vermittelte Depolarisation nozizeptiver Hinterhornneurone mit Senkung der Reizschwelle (Baba et al., 2001) bzw. durch eine Hemmung inhibitorischer Interneurone (Ahmadi et al., 2001; Reinold et al., 2005) hervorgerufen werden. Der mittlerweile post- und präsynaptisch nachgewiesene EP₂-Rezeptor scheint also ebenfalls an der Ausbildung einer PGE₂-vermittelten spinalen Hyperalgesie beteiligt zu sein.

Unsere Versuchsreihe zur Wirkung des spinalen EP₃-Rezeptors auf das neuronale Antwortverhalten führte zu dem Schluss, dass die PGE₂-Antwort unter normalen (d. h. nicht-entzündlichen) Bedingungen nicht über diesen Rezeptor vermittelt wird, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien (z. B. Shibuya et al., 2002) deckt. Die EP₃-vermittelte Senkung des cAMP-Spiegels scheint vielmehr erst bei entzündungsbedingt gesteigerter cAMP-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf das neuronale Antwortverhalten mit resultierender Hemmung entzündlicher Hyperalgesie zu haben (Bär et al., 2004; Hasegawa et al., 1996). Den Studien von Minami et al. (2001) und Kumazawa et al. (1993, 1996)

zufolge kann PGE_2 zwar Hyperalgesie über den EP_3 -Rezeptor vermitteln, diese Abweichung von den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen könnte allerdings daran liegen, dass möglicherweise die Wirkung des exzitatorisch wirkenden $\text{EP}_{3\beta}$ -Rezeptors überwog.

Die Untersuchung des EP_4 -Rezeptors mittels Applikation des spezifischen Agonisten ONO-AE1-329 ergab ebenfalls eine Beteiligung des EP_4 -Rezeptors an der PGE_2 -vermittelten Veränderung des Antwortverhaltens nozizeptiver Hinterhornneurone. Die Aktivierung des EP_4 -Rezeptors induziert unter Normalbedingungen über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels eine Steigerung der neuronalen Antwort auf mechanische Reizung sowie eine zentrale Sensibilisierung (Southall & Vasko, 2001). Unter entzündlichen Bedingungen bewirkt der EP_4 -Rezeptor keine weitere Steigerung der neuronalen Antwort (Bär et al., 2004), was vermutlich daran liegt, dass der cAMP-Spiegel durch die Entzündung bereits erhöht ist.

5.8 Fazit

Während in unserer Studie drei der untersuchten EP-Rezeptoren (EP_1 , EP_2 , EP_4) im Rückenmark bei Aktivierung eine neuronale Übererregbarkeit sowie die Ausbildung einer zentralen Sensibilisierung mit resultierender Vergrößerung des rezeptiven Feldes induzierten, ergab die Aktivierung des EP_3 -Rezeptors mittels Applikation eines spezifischen Agonisten unter normalen Bedingungen keine signifikante Veränderung der neuronalen Antwort auf mechanische Stimuli. Es ist daher anzunehmen, dass die schmerzsteigernde Wirkung von PGE_2 , welches z. B. bei einer Gelenkentzündung (Arthritis) im Rückenmark verstärkt ausgeschüttet wird, unter anderem über die drei erstgenannten PGE_2 -Rezeptoren (EP_1 , EP_2 , EP_4) vermittelt wird. Noch bleibt unklar, warum so viele unterschiedliche spinale EP-Rezeptor-Subtypen vorhanden sind, die zumindest unter Normalbedingungen die gleichen PGE_2 -Wirkungen vermitteln. Es ist zu vermuten, dass die PGE_2 -Wirkung unter entzündlichen Bedingungen durch unterschiedliche EP-Rezeptoren mit ihren verschiedenen Wirkmechanismen und Wirkorten differenzierter vermittelt werden kann, als dies bei nur einem Rezeptor möglich wäre. Zur Klärung dieser Frage ist die Durchführung weiterer Entzündungsstudien sinnvoll.

5.9 Ausblick

Eine wichtige Rolle bei der Behandlung von entzündlichem Gelenkschmerz kommt neben Glucocorticoiden den nicht-steroidalen Antirheumatika zu, welche entweder über eine irreversible (z. B. Acetylsalicylsäure) bzw. eine reversible (z. B. Indomethacin, Diclofenac Ibuprofen) Hemmung der Cyclooxygenase (COX) die Prostaglandinsynthese unselektiv blockieren. Dieser Effekt tritt auch am Rückenmark auf (Vanegas & Schaible, 2001). Da diese Inhibierung nicht nur die Synthese von PGE₂, sondern auch die von PGD₂ oder PGF₂ betrifft, werden nicht nur die typischen Prostaglandin-vermittelten Entzündungsreaktionen unterdrückt (z. B. Hyperalgesie, Fieber und Schwellung), sondern auch protektive Prostaglandineffekte. Dies führt bei Behandlung mit nicht-steroidalen Antirheumatika neben den erwünschten Wirkungen auch zu unerwünschten Effekten, wie z. B. Schleimhautschädigungen im Gastrointestinaltrakt, Wehenschwäche oder einer Wasser-Salz-Retention. Des Weiteren kommt es durch die Blockierung der Cyclooxygenase zu einem relativen Überschuss der Leukotrien-Produktion, was zu einem verstärkten Auftreten von allergischen Reaktionen führen kann (vgl. Lüllmann & Mohr, 1999). Um die unerwünschten Effekte einer COX-Inhibierung mit resultierender unselektiver Prostaglandinsynthese-Hemmung zu vermeiden, wird die Entwicklung von Analgetika angestrebt, die selektiver als die herkömmlichen Cyclooxygenasehemmer lediglich die unerwünschten Prostaglandin-Effekte blockieren. Nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass sich Ergebnisse von Medikamentenstudien an Ratten häufig auf den Menschen übertragen lassen, könnte die hier vorgestellte Studie eine Grundlage für die Entwicklung neuer Wirkstoffe liefern. Vorstellbar wäre zum Beispiel die gezielte medikamentöse Blockierung der Prostaglandinrezeptoren EP₁, EP₂ und EP₄, welche in unserer Studie alle zur Entwicklung einer spinalen Übererregbarkeit beitrugen. Im Gegenzug wäre bei Entzündungsschmerzen eine selektive Aktivierung des EP_{3α}-Rezeptors denkbar, der in verschiedenen Untersuchungen (z. B. Bär et al., 2004) unter entzündlichen Bedingungen eine Senkung der spinalen Übererregbarkeit vermittelte. Um weitere Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Analgetika zu schaffen, müssten die bisher zu den EP-Rezeptoren durchgeführten Studien noch durch weitere Untersuchungen vervollständigt werden:

- Nach den bisherigen Erkenntnissen könnte eine selektive Blockierung der EP₁, EP₂ und EP₄-Rezeptoren wirkungsvoll zur Behandlung von Entzündungsschmerzen eingesetzt werden. Die einzelnen EP-Rezeptor-Subtypen müssten deshalb

sinnvollerweise im Verlauf von Entzündungen untersucht werden, um zu klären, inwiefern man sich ihre spezifischen Wirkungen zunutze machen könnte.

- Es müsste noch genauer auf die spezifischen Funktionen der einzelnen EP₃-Subtypen (EP_{3α}, EP_{3β}, EP_{3γ}) eingegangen werden, da hierzu in der gegenwärtigen Literatur noch kein Konsens besteht.
- Besonders die Wirkung des EP₃-Rezeptors unter entzündlichen Bedingungen sollte näher untersucht werden, da sich hier möglicherweise ebenfalls neue Strategien für die Behandlung von Entzündungsschmerz aufzeigen.
- Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse zur Funktion der EP-Rezeptoren sollte ein weiteres Augenmerk auf der Entwicklung neuer Testsubstanzen liegen, da bisher noch nicht für alle EP-Rezeptoren spezifische Antagonisten entwickelt werden konnten.

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse lassen jedoch bereits darauf hoffen, dass in näherer Zukunft mittels gezielter Blockierung bzw. Aktivierung einzelner Prostaglandin-Rezeptoren neue Wege in der Behandlung von entzündlichen Schmerzen beschritten werden könnten, und die bisher etablierten, nicht-steroidalen Antirheumatika mit ihren zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen möglicherweise eine Ablösung durch potentere und nebenwirkungsärmere Substanzen erfahren könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W. L., Zeilhofer, H. U. (2002). PGE₂ selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nature Neuroscience*, 5(1), 34-40.
- An, S., Yang, J., Xia, M., Goetzl, E. J. (1993). Cloning and expression of the EP2 subtype of human receptors for prostaglandin E2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(1), 263-270.
- Andersen, N. H., Eggerman, T. L., Harker, L. A., Wilson, C. H., De, B. (1980). On the multiplicity of platelet prostaglandin receptors. I. Evaluation of competitive antagonism by aggregometry. *Prostaglandins*, 19(5), 711-735.
- Baba, H., Kohno, T., Moore, K. A., Woolf, C. J. (2001). Direct activation of rat spinal dorsal horn neurons by prostaglandin E2. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1750-1756.
- Bär, K. J., Natura, G., Telleria-Diaz, A., Teschner, P., Vogel, R., Vasquez, E., Schaible H. G., Ebersberger, A. (2004). Changes in the Effect of Spinal Prostaglandin E₂ during Inflammation: Prostaglandin E (EP1-EP4) Receptors in Spinal Nociceptive Processing of Input from the Normal or Inflamed Knee Joint. *The Journal of Neuroscience*, 24(3), 642-651.
- Bastepe, M., Ashby, B. (1997). The long cytoplasmic carboxyl terminus of prostaglandin E receptor EP4 subtype is essential for agonist-induced desensitization. *Molecular Pharmacology*, 51, 343-349.
- Bastepe, M., Ashby, B. (1999). Identification of a region of the C-terminal domain involved in short-term desensitization of the prostaglandin EP4 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 126(1), 365-371.

- Beiche, F., Scheuerer, S., Brune, K., Geisslinger, G., Goppelt-Struebe, M. (1996). Up-regulation of Cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters*, 390(2), 165-169.
- Beiche, F., Klein, T., Nusing, R., Neuhuber, W., Goppelt-Struebe, M. (1998a). Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *Journal of Neuroimmunology*, 89(1-2), 26-34.
- Beiche, F., Brune, K., Geisslinger, G., Goppelt-Struebe, M. (1998b). Expression of Cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. *Inflammation Research*, 47(12), 482-487.
- Bito, L. Z. (1972). Accumulation and apparent active transport of prostaglandins by some rabbit tissues in vitro. *Journal of Physiology*, 221(2), 371-387.
- Buddecke, E. und Fischer, M. (1992). *Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie*. Berlin: de Gruyter.
- Butcher, R. W., Sutherland, E. W. (1967). The effects of the catecholamines, adrenergic blocking agents, prostaglandin E₁, and insulin on cyclic AMP levels in the rat epididymal fat pad in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 139(3), 849-859.
- Cerne, R., Jiang, M., Randic, M. (1992). Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate potentiates excitatory amino acid and synaptic responses of rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Research*, 596(1-2), 111-23.
- Coderre, T.J., Gonzales, R., Goldyne, M. E., West, J., Levine, J. D. (1990). Noxious stimulus-induced increase in spinal prostaglandin E2 is noradrenergic terminal-dependent. *Neuroscience Letters*, 115(2-3), 253-8.

- Coleman, R. A., Kennedy, I., Humphrey, P. P. A., Bunce, K., Lumley, P (1990). *Prostanoids and their receptors*. In: Emmet, J. C. (Ed.), *Comprehensive Medicinal Chemistry. Membranes and Receptors*. Oxford, UK: Pergamon, vol 3, 643-714.
- Desai, S., April, H., Nwaneshiudu, C., Ashby, B. (2000). Comparison of Agonist-induced Internalization of the Human EP2 and EP4 Prostaglandin Receptors: Role of the Carboxyl Terminus in EP4 Receptor Sequestration. *Molecular Pharmacology*, 58(6), 1279-1286.
- Dirig, D. M. und Yaksh, T. L. (1999). In vitro prostanoid release from spinal cord following peripheral inflammation: effects of substance P, NMDA and capsaicin. *British Journal of Pharmacology*, 126(6), 1333-1340.
- Donaldson, L. F., Humphrey, P. S., Oldfield, S., Giblett, S., Grubb, B. D. (2001). Expression and regulation of prostaglandin E receptor subtype mRNAs in rat sensory ganglia and spinal cord in response to peripheral inflammation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 63(3), 109 – 122.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science*, 294(5548), 1871-1875.
- Gardiner, P. J. und Collier, H. O. (1980). Specific receptors for prostaglandins in airways. *Prostaglandins*, 19(6), 819-841.
- Gasser, H. S. und Grundfest, H. (1939). Axon diameters in relation to the spike dimension and the conduction velocity in mammalian A-fibers. *American Journal of Physiology*, 127, 393-414.
- Gerdesmeyer, L., Haake, M., Goebel, M., Wagner, K. (2004). Der Rückenschmerz. *Notfall & Hausarztmedizin (Notfallmedizin)*, 30, 319-324.
- Grubb, B. D., Stiller, R. U., Schaible, H. G. (1993). Dynamic changes in the receptive field properties of spinal cord neurons with ankle input in rats with chronic unilateral inflammation in the ankle region. *Experimental Brain Research*, 92(3), 441-452.

- Handwerker, H. O. (2001). *Nozizeption und Schmerz*. In: Schmidt, R. F. und Schaible H.-G. (Eds.), *Neuro- und Sinnesphysiologie*, S. 258-271. Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Santa Clara Singapur Tokyo: Springer.
- Hartell, N. A., Headley, P. M. (1990). Spinal effects of four injectable anaesthetics on nociceptive reflexes in rats: a comparison of electrophysiological and behavioural measurements. *British Journal of Pharmacology*, 101(3), 563-568.
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Zeilhofer, H. U., Müller, U. (2004). GlyR α 3: An Essential Target for Spinal PGE₂-Mediated Inflammatory Pain Sensitization. *Science*, 304(5672), 884-887.
- Hua, X. Y., Chen, P., Marsala, M., Yaksh, T. L. (1999). Intrathecal substance P-induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids. *Neuroscience*. 89(2), 525-34.
- Jänig, W. (1993). *Biologie und Pathobiologie der Schmerzmechanismen*. In: Zenz, M., und Jurna, I. (Eds.), *Lehrbuch der Schmerztherapie*, S. 15-33. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Jones, R. L., Peesapati, V., Wilson, N. H. (1982). Antagonism of the thromboxane-sensitive contractile systems of the rabbit aorta, dog saphenous vein and guinea-pig trachea. *British Journal of Pharmacology*, 76(3), 423-438.
- Kawamura, T., Yamauchi, T., Koyama, M., Maruyama, T., Akira, T., Nakamura, N. (1997). Expression of prostaglandin EP₂ receptor mRNA in the rat spinal cord. *Life Science*, 61(21), 2111-2116.
- Kennedy, I., Coleman, R. A., Humphrey, P. P., Levy, G. P., Lumley, P. (1982). Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins*, 24(5), 667-689.

- Kuehl, F. A. und Humes, J. L. (1972). Direct evidence for a prostaglandin receptor and its application to prostaglandin measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(2), 480-484.
- Kumazawa, T., Mizumura, K., Koda, H. (1993). Involvement of EP3 subtype of prostaglandin E receptors in PGE₂-induced enhancement of the bradykinin response of nociceptors. *Brain Research*, 632(1-2), 321-324.
- Kumazawa, T., Mizumura, K., Koda, H., Fukusako, H. (1996). EP receptor subtypes implicated in the PGE₂-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. *Journal of Neurophysiology*, 75: 2361-2368.
- Lloyd, D. P. C. und Chang, H. T. (1948). Afferent fibres in muscle nerves. *Journal of Neurophysiology*, 11(3), 199-207.
- Löffler, G. (2003). *Stoffwechsel von Triacylglycerinen und Fettsäuren*. In: Löffler, G. und Petrides, P. E. (Eds.), *Biochemie und Pathobiochemie* (7. Auflage). S. 434-460. Berlin Heidelberg New York Hongkong London Mailand Paris Tokio: Springer.
- Lüllmann, H. und Mohr, K. (1999). *Nozizeptives System*. In: Lüllmann, H. und Mohr, K. (Eds.), *Pharmakologie und Toxikologie* (14. komplett überarbeitete und neu gestaltete Auflage). S. 250-283. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Malmberg, A. B. und Yaksh, T. L. (1995a). Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *Journal of Neuroscience*, 15(4), 2768-76.
- Malmberg, A. B. und Yaksh, T. L. (1995b). The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis in conscious rats. *British Journal of Pharmacology*, 114(5), 1069-75.

- Matsumoto, S., Ikeda, M., Yoshida, S., Tanimoto, T., Takeda, M., Nasu, M. (2005). Prostaglandin E₂-induced modification of tetrodotoxin-resistant Na⁺-currents involves activation of both EP₂ and EP₄ receptors in neonatal rat nodose ganglion neurones. *British Journal of Pharmacology*, 145(4), 503-13.
- Meßlinger, K. (2002). Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentstehung. *Manuelle Medizin*, 40: 13 – 21.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1):1-164.
- Minami, T., Nishihara, I., Uda, R., Ito, S., Hyodo, M., Hayaishi, O. (1994). Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E₂ to mice. *British Journal of Pharmacology*, 112, 735-740.
- Minami, T., Nakano, H., Kobayashi, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ichikawa, A., Narumiya, S., Ito, S. (2001). Characterization of EP receptor subtypes responsible for prostaglandin E₂-induced pain responses by use of EP₁ and EP₃ receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, 133, 438 – 444.
- Nakayama, Y., Omote, K., Namiki, A. (2002). Role of Prostaglandin Receptor EP₁ in the Spinal Dorsal Horn in Carrageenan-induced Inflammatory Pain. *Anesthesiology*, 97, 1254-1262.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79(4), 1193-1226.
- Negishi, M., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. (1995). Molecular mechanisms of diverse actions of Prostanoid receptors. *Biochimica et biophysica acta*, 1259, 109-120.

- Neugebauer, V., Lucke, T., Schaible, H. G. (1993). N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *Journal of Neurophysiology*, 70(4), 1365-77.
- Neugebauer, V., Schaible, H. G. (1988). Peripheral and spinal components of the sensitization of spinal neurons during an acute experimental arthritis. *Agents and actions*, 25(3-4), 234-236.
- Neugebauer, V., Schaible, H. G. (1990). Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee. *Journal of Neurophysiology*, 64(1), 299-311.
- Nguyen, M., Camenisch, T., Snouwaert, J. N., Hicks, E., Coffman, T. M., Anderson, P.A., Malouf, N. N., Koller, B. H. (1997). The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature*, 390(6655), 78-81.
- Nishigaki, N., Negishi, M., Ichikawa, A. (1996). Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Molecular Pharmacology*, 50(4), 1031-1037.
- Oida, H., Namba, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1995). In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. *British Journal of Pharmacology*, 116(7), 2828-2837.
- Omote, K., Kawamata, T., Nakayama, Y., Yamamoto, H., Kawamata, M., Namiki, A. (2002). Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP₄ on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology*, 97, 170-176.
- Pickles, V. R. (1967). *The myometrical actions of six prostaglandins: consideration of a receptor hypothesis*. In: Bergström, S., Samuelsson, B. (Eds.), Nobel Symposium. Prostaglandins. Stockholm: Almquist & Wicksell, vol. 2, 79-83.

- Regan, J. W., Bailey, T. J., Pepperl, D. J., Pierce, K. L., Bogardus, A. M., Donello, J. E., Fairbairn, C. E., Kedzie, K. M., Woodward, D. F., Gil, D. W. (1994). Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Molecular Pharmacology*, 46(2), 213-230.
- Reinold, H., Ahmadi, S., Depner, U. B., Layh, B., Heindl, C., Hamza, M., Pahl, A., Brune, K., Narumiya, S., Müller, U., Zeilhofer, H. U. (2005). Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP2 subtype. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 673-679.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 96(3), 415 – 495.
- Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V., Woolf, C. J. (2001). Interleukin 1 β -mediated induction of Cox 2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410(6827), 425-427.
- Sandkühler, J. (2005). Neurobiologische Grundlagen des Schmerzgedächtnisses. *Psychoneuro*, 31(2): 77 – 80.
- Sandkühler, J. und Liu, X. (1998). Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *European Journal of Neuroscience*, 10(7), 2476-2480.
- Schaible, H. G. und Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 389(4), 237-243.
- Schaible, H. G. und Schmidt, R. F. (1995). *Nozizeption und Schmerz* In: Schmidt, R. F. und Thews, G. (Eds.), *Physiologie des Menschen*, S. 236-250. Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Santa Clara Singapur Tokyo: Springer.

- Schaible, H. G., Schmidt, R. F., Willis, W. D. (1987). Convergent inputs from articular, cutaneous and muscle receptors onto ascending tract cells in the cat spinal cord. *Experimental Brain Research*, 66(3), 479-488.
- Schmidt, R. F. und Thews, G. (Eds.), *Physiologie des Menschen*. Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Santa Clara Singapur Tokyo: Springer.
- Shibuya, I., Setiadji, S. V., Ibrahim, N., Harayama, N., Maruyama, T., Ueta, Y., Yamashita, H. (2002). Involvement of postsynaptic EP4 and presynaptic EP3 receptors in actions of prostaglandin E2 in rat supraoptic neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(1), 64-72.
- Southall, M. D., Vasko, M. R. (2001). Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), 16083-16091.
- Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1992). Cloning and Expression of a cDNA for Mouse Prostaglandin E Receptor EP₃ Subtype. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(10), 6463-6466.
- Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Mizuno, N., Narumiya, S., Ichikawa, A. (1994). Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP₃ in the mouse nervous system. *Neuroscience*, 62, 919-928.
- Suzawa, T., Miyaura, C., Inada, M., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ichikawa, A., Narumiya, S., Suda, T. (2000). The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP₁, EP₂, EP₃, and EP₄) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology*, 141, 1554-1559.
- Taiwo, Y. O. und Levine, J. D. (1988). Prostaglandins inhibit endogenous pain control mechanisms by blocking transmission at spinal noradrenergic synapses. *The Journal of Neuroscience*, 8(4), 1346-1349.

- Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M., Hayaishi, O. (1990). Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D2, E2 or F2 alpha to conscious mice. *Brain research*, 510(1), 26-32.
- Vanegas, H. und Schaible, H. G. (2001). Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology*, 64(4), 327-63.
- Vasquez, E., Bär, K. J., Ebersberger, A., Klein, B., Vanegas, H., Schaible, H. G. (2001), Spinal Prostaglandines are Involved in the Development but not the Maintenance of Inflammation-induced Spinal Hyperexcitability. *The Journal of Neuroscience*, 21(22), 9001-9008.
- Willingale, H. L., Gardiner, N. J., McLymont, N., Giblett, S., Grubb, B. D. (1997). Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *British Journal of Pharmacology*. 122(8), 1593-604.
- Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306(5944), 686-688.
- Yamamoto, H., Maruyama, T., Sakata, K., Koketsu, M., Kobayashi, M., Yoshida, H., Seki, A., Tani, K., Maruyama, T., Kondo, K., Ohuchida, S. (1999). Novel four selective agonists for prostaglandin E receptor subtypes. *Prostaglandins and other lipid mediators*, 59, 150.
- Yang, L. C., Marsala, M., Yaksh, T. L. (1996a). Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. *Pain*, 67(2-3), 345-54.
- Yang, L. C., Marsala, M., Yaksh, T. L. (1996b). Effect of spinal kainic acid receptor activation on spinal amino acid and prostaglandin E2 release in rat. *Neuroscience*, 75(2), 453-61.

Zenker, W. (1994). *Feinbau von Rückenmark und Spinalganglien*. In: Drenckmann, D. und Zenker, W. (Eds.), Benninghoff Anatomie, Band 2. München Wien Baltimore: Urban & Schwarzenberg.

Zenz, M., und Jurna, I. (Eds.), *Lehrbuch der Schmerztherapie*, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Zimmermann, M. (1984). *Physiologie von Nozizeption und Schmerz*. In: Zimmermann, M. und Handwerker, H. O. (Eds.), Schmerz – Konzepte und ärztliches Handeln. S. 1 – 43. Berlin: Springer-Verlag.

Zimmermann, M. (1993). *Physiologische Grundlagen des Schmerzes und der Schmerztherapie*. In: Zenz, M. und Jurna, I. (Eds.), Lehrbuch der Schmerztherapie. S. 3-13. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Internetreferenzen:

I: www.tu-berlin.de/fak8/ifg/psychologie/Wilz/Folien_Vorlesung301104_sw.pdf
(Stand: April 2006)

II: www.bmbf.de/de/1164.php (Stand: April 2006)

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Klassifikation der Nervenfasern nach Erlanger / Gasser.....	6
Tabelle 3.1:	kompletter Rohdatensatz des Experimentes P197.....	39
Tabelle 4.1:	über alle Versuche mit Tyrode gemittelte AP / 15 sec.....	42
Tabelle 4.2:	über alle Versuche mit PGE ₂ gemittelte AP / 15 sec.....	44
Tabelle 4.3:	über alle Versuche mit ONO-DI-004 gemittelte AP / 15 sec.....	45
Tabelle 4.4:	über alle Versuche mit Butaprost gemittelte AP / 15 sec.....	49
Tabelle 4.5:	über alle Versuche mit Butaprost gemittelte AP / 15 sec.....	52
Tabelle 4.6:	über alle Versuche mit Butaprost gemittelte AP / 15 sec.....	55

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Nozizeptor	6
Abbildung 2.2:	Laminae des Hinterhorns	8
Abbildung 2.3:	Afferenzen des Hinterhorn	9
Abbildung 2.4:	Synthese der Prostanoid	15
Abbildung 2.5:	Struktur des menschlichen TxA_2 - Rezeptors	17
Abbildung 3.1:	Schematischer Versuchsaufbau	31
Abbildung 3.2:	Rezeptives Feld	33
Abbildung 3.3:	Zeitlicher Ablauf der Stimuli	35
Abbildung 3.4:	Versuchsprotokoll mit drei verschiedenen Konzentrationen des Agonisten	36
Abbildung 3.5:	Beispielhafte Darstellung der Versuchsnormierung	38
Abbildung 3.6:	Verlauf P197	40
Abbildung 4.1:	noxische Reizung des Kniegelenks unter Applikation von Tyrode	43
Abbildung 4.2:	Verlauf des Antwortverhaltens bei noxischer Reizung des Kniegelenks	44
Abbildung 4.3:	Verlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone während Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter EP_1 -Aktivierung	47
Abbildung 4.4:	durchschnittlicher Anstieg der Antwortrate während der einzelnen Konzentrationsblöcke unter EP_1 -Aktivierung.....	48
Abbildung 4.5:	Verlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone während Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter EP_2 -Aktivierung	50
Abbildung 4.6:	durchschnittlicher Anstieg der Antwortrate während der einzelnen Konzentrationsblöcke unter EP_2 -Aktivierung.....	51
Abbildung 4.7:	Verlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone während Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter EP_3 -Aktivierung	53
Abbildung 4.8:	durchschnittlicher Anstieg der Antwortrate während der einzelnen Konzentrationsblöcke unter EP_3 -Aktivierung.....	54
Abbildung 4.9:	Verlauf des Antwortverhaltens der untersuchten Neurone während Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote unter EP_4 -Aktivierung	56
Abbildung 4.10:	durchschnittlicher Anstieg der Antwortrate während der einzelnen Konzentrationsblöcke unter EP_4 -Aktivierung.....	57

9 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Hans-Georg Schaible für die interessante Aufgabenstellung sowie die stets konstruktive und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger bedanken, die immer mit besonderer Ausdauer Antworten auf all meine zahlreichen Fragen beim Verfassen des Manuskriptes parat hatte und nie mit guten Ratschlägen geizte.

Bei Professor Dr. med. Karl-Jürgen Bär möchte ich mich ganz herzlich für die gute und angenehme Betreuung bei der Durchführung der Versuche und der Auswertung der Versuchsergebnisse bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Gabriele Cuny, durch deren gute Vorbereitung und tatkräftige Unterstützung die Experimente erst durchführbar wurden.

Großer Dank gebührt auch meiner Familie und all den Freunden, die nie den Glauben daran verloren haben, dass diese Arbeit doch irgendwann zu einem Abschluss kommen würde.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Frau Ulrike, meinem steten, unermüdlichen Ansporn, die es, auch wenn ich es ihr oft wahrlich sehr schwer gemacht habe, nie leid wurde, immer wieder neue Motivationsstrategien für mich zu entwickeln und deren Liebe und Vertrauen in mich es alleine zu verdanken sind, dass diese Dissertation nicht lebenslänglich wie ein Damoklesschwert über mir hängen wird. Der wohl größte Anreiz für mich, diese Arbeit endlich zu beenden, war die Vorfreude darauf, mich endlich ungestört um sie und in Kürze auch unsere Tochter kümmern zu können. Diesen beiden sei darum diese Arbeit gewidmet.

LebenslaufAllgemeine Angaben

Name: Teschner
Vorname: Philipp
Geburtsdatum: 29.06.1977
Geburtsort: Nürnberg

Schul Ausbildung

1983 – 1987 Grundschole in Rothenburg ob der Tauber
1987 – 1996 Reichsstadt-Gymnasium, Rothenburg o.d.T.
Leistungskurse Mathematik / Physik
Juni 1996 Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Weiterführende Ausbildung

10/1997 – 06/2004 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Erstes Staatsexamen Frühjahr 2001
Zweites Staatsexamen Sommer 2002

Medizinisches Praktisches Jahr:

Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Sophien- und-Hufeland-Klinikums Weimar

Klinik für Anästhesiologie- und Intensivmedizin des SHK Weimar

Klinik für Innere Medizin II des SHK Weimar

Juni 2004 Drittes Staatsexamen und Erteilung der Approbation

Berufliche Tätigkeit

10/2004 – 09/2005 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Sophien- und-Hufeland-Klinikums Weimar

10/2005 – 12/2006 Assistenzarzt im Zentrum für Physikalische und Rehabilitative Medizin des Sophien- und-Hufeland-Klinikums Weimar

seit 01/2007 Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, 18.06.2007

Philipp Teschner

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. H.-G. Schaible

PD Dr. rer. nat. A. Ebersberger

Prof. Dr. med. K.-J. Bär

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 18. Juni 2007

Philipp Teschner